



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Dinámica y especialización funcional de las Células
Dendríticas y Macrófagos pulmonares durante reacciones
alérgicas**

Tesis doctoral

María Minguito de la Escalera, licenciada en Biotecnología

Director: Carlos Ardavín

Madrid, 2015

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC (Madrid), bajo la dirección del **Doctor Carlos Ardavín**.

A mis padres

INDEX

5 ÍNDICE**9 ABREVIATURAS****13 SUMMARY****17 INTRODUCCIÓN****20 Respuestas alérgicas**

21 Basófilos

21 Mastocitos

22 Eosinófilos

22 Inducción de la respuesta alérgica frente a HDM

25 Origen de las poblaciones de monocitos y DCs

26 Monocitos

28 Células dendríticas

31 Macrófagos

37 OBJETIVOS**41 MATERIALES Y****41 MÉTODOS****43 1.- Materiales biológicos**

43 1.1 Ratones

43 2.- Reactivos

43 2.1 Medios de cultivo

43 2.2 Anticuerpos monoclonales

44 3.- Metodología

44 3.1 Preparación de suspensiones celulares

45 3.2 Aislamiento de poblaciones celulares

46 3.3 Cultivos celulares

47 3.4 Tinción GIEMSA

47 3.5 Marcaje con CFSE

47 3.6 Microarrays

47 3.7 Ensayos *in vivo*

49 3.8 Citometría de flujo

51 RESULTADOS**53 Papel de IL-4 en el acondicionamiento de las moDCs para la inducción de respuestas Th2****56 Definición de las poblaciones leucocitarias pulmonares en reposo**

57 Sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar

62 Otras poblaciones pulmonares

62 Variaciones en las poblaciones pulmonares leucocitarias durante la respuesta alérgica frente a HDM

62 Análisis de la reacción alérgica frente a HDM

63 Variaciones en el sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar durante la respuesta alérgica frente a HDM

65 Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} durante la respuesta alérgica frente a HDM

66	Caracterización de las moDCs por CCR2 y MerTK
66	Especialización funcional de las DCs
69	Impacto de la deficiencia de CCR2 en las poblaciones leucocitarias pulmonares durante la respuesta alérgica frente a HDM
69	Análisis de la reacción alérgica frente a HDM en ratones CCR2 ^{-/-}
70	Variaciones en el sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar en ratones CCR2 ^{-/-} durante la respuesta alérgica frente a HDM
71	Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C ^{hi} en ratones CCR2 ^{-/-} durante la respuesta alérgica frente a HDM
72	Expresión de CCR2 por parte de las cDCs
73	Regulación de la respuesta alérgica por células de origen monocítico
73	Impacto de la deficiencia de CCR2 en la regulación de la respuesta alérgica frente a HDM
74	Impacto de la deficiencia de IFNAR en la regulación de la respuesta alérgica frente a HDM
77	Cinética de las poblaciones alveolares
77	Cinética de los AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM
81	Cinética de los eosinófilos alveolares durante la respuesta alérgica frente a HDM
83	Análisis de la inducción de apoptosis en los AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM
86	Análisis de la regeneración de los AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM
87	Cinética de las poblaciones alveolares durante la infección por <i>K. pneumoniae</i>
91	DISCUSIÓN
93	Papel de IL-4 en el acondicionamiento de las moDCs para la inducción de respuestas Th2
94	Definición de las poblaciones monocítico-DC-macrofágicas pulmonares
94	Análisis de las moDCs en los pulmones de ratones en reposo
94	Análisis de los iMØs en los pulmones de ratones en reposo
95	Diferenciación de monocitos Ly-6C ^{hi} en moDCs
96	Impacto de la deficiencia de monocitos en la regulación de la respuesta alérgica frente a HDM
97	Cinética de las poblaciones alveolares
97	Apoptosis de AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM
99	Regeneración de AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM
101	Cinética de las poblaciones alveolares durante la respuesta frente a <i>K. pneumoniae</i>
103	CONCLUSIONES
107	BIBLIOGRAFÍA
123	ANEXO
137	AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

AMØ:	macrófago alveolar	i.v.:	intra-venoso
APC:	aloficocianina	IFN:	interferón
ATP:	adenosin trifosfato	IFN-I:	interferón de tipo I
BAL:	lavado bronqueoalveolar	IFN-γ:	interferón γ
BMDCs:	DCs derivadas de médula ósea	IFNAR:	cadena α del receptor de IFN-I
CCL:	ligando de quimioquinas	Igs:	inmunoglobulinas
CCR:	receptor de quimioquinas	IL:	interleuquina
CD:	antígeno de diferenciación	ILCs:	células linfoides innatas
cDC:	célula dendrítica convencional	iMØ:	macrófago intersticial
CDP:	precursor común de DCs	LN:	ganglio linfático
CFSE:	carboxifluoresceína	LPS:	lipopolisacárido bacteriano
cMoP:	precursor común de monotitos.	M-LN:	ganglio linfático mediastinal
CLP:	precursor común linfoide	mAbs:	anticuerpos monoclonales
CMP:	precursor común mieloide	MACS:	separación celular magnética
DC:	célula dendrítica	MDP:	precursor común de macrófagos y DCs
Der p:	<i>Dermatofagoides pteronyssinus</i>	MHC:	complejo principal de histocompatibilidad
EDTA:	ácido etilendiamonotetraacético	MHCII:	complejo principal de histocompatibilidad tipo II
ELISA:	ensayo colorimétrico	moDC:	célula dendrítica derivada de monocito
FCS:	suero fetal de ternera	mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
FITC:	isotiocianato de fluoresceína	MyD88:	factor de diferenciación mieloide 88
Flt3:	<i>fms-like tirosina kinase</i>	NFκB:	factor nuclear κ B
FSC:	tamaño	NK:	célula <i>natural killer</i>
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos	OVA:	ovalbúmina
HDM:	ácaros del polvo	PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos
HSCs:	células madre hematopoyéticas	PB:	<i>pacific blue</i>
i.n.:	intra-nasal		
i.p.:	intra-peritoneal		
i.t.:	intra-traqueal		

PBS:	tampón fosfato salino	SSC:	complejidad
pDC:	célula dendrítica plasmacitoide	TCR:	receptor de células T
PE:	ficoeritrina	Th:	células T colaboradoras
PerCP:	peridina de clorofila A	Th1:	células Th de tipo 1
pre-DC:	precursor de cDCs;	Th17:	células Th de tipo 17
Pre-DCs:	precursor de células dendríticas convencionales	Th2:	células Th de tipo 2
PRRs:	receptores de reconocimiento de patrones	TLRs:	receptores <i>toll like</i>
ROS:	especies reactivas de oxígeno	Treg:	células T reguladoras
RT-PCR:	transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa	TSLP:	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>

SUMMARY

We have analyzed the kinetics of the lung monocyte-DC-macrophage system, as well as the contribution of Ly-6C^{high} monocytes to the generation of these populations, using a lung allergy model against House Dust Mite (HDM). The dynamics of lung populations in C57BL/6 and in mice deficient in CCR2, a chemokine that controls Ly-6C^{high} monocytes egression from bone marrow, indicate that recruited monocytes differentiate *in situ* into moDCs during HDM-induced allergy. Additionally, we have observed that monocyte blockade correlates to a higher allergic reaction. These data suggest that monocytes and/or monocyte-derived cells could play a role in the negative regulation of HDM-induced allergy.

Furthermore, we have studied alveolar populations during the allergic response. Our data suggest that alveolar macrophages undergo an apoptotic process that leads to a massive disappearance of this cell population during a strong allergic reaction to HDM, paralleled by the peak of alveolar eosinophilia. Once the allergic response dampens, the alveolar macrophage population recovers, but the newly formed alveolar macrophage population differs phenotypically from the pre-existing population. This transient alveolar macrophage disappearance does not occur during *Klebsiella pneumoniae* infection, suggesting a link between eosinophil induced damage and alveolar macrophages disappearance.

INTRODUCCIÓN

El término “alergia” fue acuñado en 1906 por el Dr. Clemens Von Pirquet para definir un tipo especial de respuesta inmunitaria frente a sustancias que normalmente no inducen reacciones en la mayoría de las personas. Las reacciones alérgicas pueden conducir a alteraciones clínicas severas, tales como el asma o la anafilaxis, y en última instancia incluso a la muerte. Los síntomas de la alergia varían según la causa y la gravedad. En el caso particular de las alergias desarrolladas en las vías aéreas, los síntomas más comunes son irritación de las mucosas, produciendo picor y estornudos, así como secreción de mucus. Estos síntomas se pueden agravar causando una obstrucción reversible de las vías aéreas y por lo tanto, dificultando la respiración, dando lugar a lo que se conoce como asma alérgico (Paul and Zhu, 2010).

Los alérgenos causantes de las reacciones alérgicas se diagnostican mediante pruebas cutáneas; los más comunes son los alérgenos del polen, los ácaros domésticos y los que se encuentran en el pelo de animales de compañía. Los ácaros domésticos (Figura 1, A) constituyen la causa más común y extendida de asma alérgico en el mundo. Las especies más comunes de ácaros en Europa son *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, asociados con las familias de alérgenos Der p y Der f respectivamente.

Según la GINA (Global Initiative for Asthma), 300 millones de personas padecen asma en el mundo (Figura 1, B) y se estiman unas 250.000 muertes anuales a nivel global a consecuencia de esta enfermedad. En España el asma afecta entre un 3% y un 7% a la población adulta, mientras que en niños las cifras se sitúan entre un 5% y un 10%.

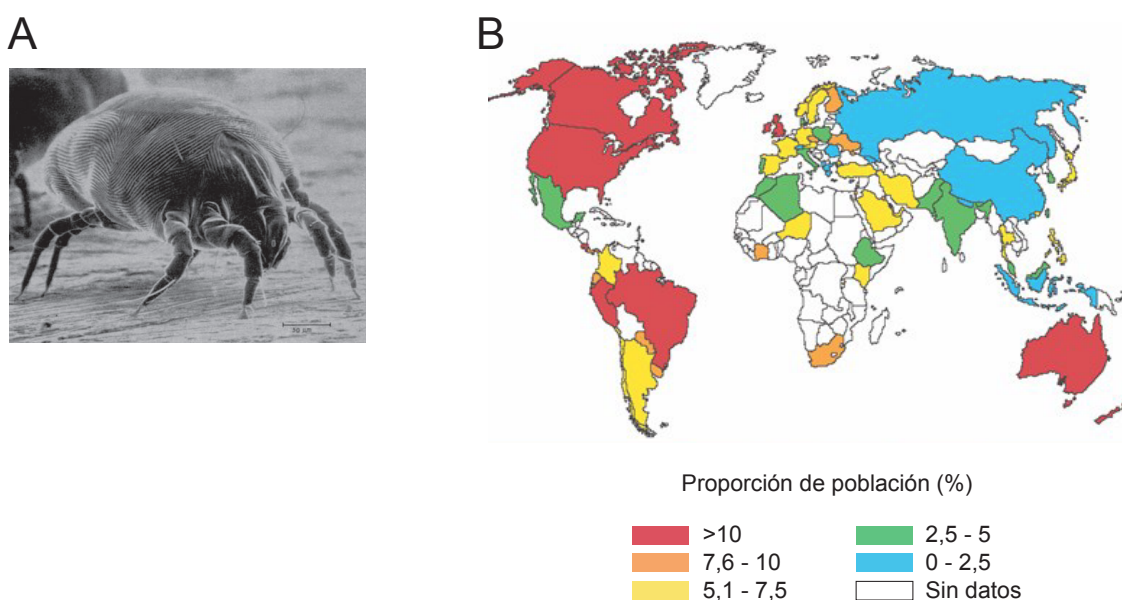


Figura 1. Alergia inducida por los ácaros del polvo. A. Microfotografía de un ácaro de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*. **B.** Incidencia del asma alérgico a nivel mundial. Los diferentes colores indican el porcentaje de la población diagnosticada, siendo rojo mayor de un 10%, naranja 7,6-10%, amarillo 5,1-7,5%, verde 2,5-5%, azul menor de un 2,5% y blanco para aquellos países de los que no se disponen datos.

Respuestas alérgicas

Las células T CD4⁺ tienen un papel principal en la respuesta inmune adaptativa. Durante la activación del TCR en un entorno concreto, las células T CD4⁺ pueden diferenciarse en diferentes tipos de células T helper, incluyendo Th1, Th2, Th17 y Treg, las cuales se definen por el patrón concreto de citoquinas producidas y por la función que llevan a cabo (Zhu et al., 2010). Las **células Th1** se inducen en respuesta a infecciones virales, bacterianas o de protozoos. Producen IFN- γ que actúa sobre las células del sistema innato, además de tener un conocido papel antiviral. Activan células T CD8⁺ citotóxicas, también necesarias en respuestas antivirales, y por último, ayudan a las células B en la producción de anticuerpos, especialmente IgG2a, inmunoglobulina implicada en opsonización, fijación de complemento y neutralización de virus. Las **células Th2** juegan un papel principal frente a infecciones causadas por helmintos, los cuales son organismos mucho más grandes y complejos que las bacterias o los virus. La producción de anticuerpos por parte de las células B favorece su fagocitosis por parte de células como los macrófagos. Las citoquinas características de una respuesta Th2 son IL-4, IL-5 e IL-13. Las **células Th17** se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F e IL-22 y actúan durante infecciones fúngicas y bacterianas mediante el reclutamiento y la activación de neutrófilos. Finalmente, las **células Treg** previenen el desarrollo de autoinmunidad regulando la respuesta frente a antígenos propios, además de limitar la inmunopatología mediante la regulación de las respuestas T efectoras; se caracterizan por la expresión del represor transcripcional Foxp3 (Walsh and Mills, 2013).

Durante las respuestas alérgicas se producen citoquinas típicas de una respuesta Th2, sin embargo se considera una respuesta Th2 anómala, ya que no se inicia como mecanismo de defensa, sino frente a antígenos ambientales inocuos. En este sentido, el antígeno es reconocido por las células dendríticas en el tejido correspondiente, son activadas y migran al ganglio linfático drenante para activar una célula T (**Figura 2**). Mientras que existen trabajos recientes que describen el mecanismo mediante el cual una DC polariza una célula T hacia Th1 o Th17, la especialización funcional que permite a una DC polarizar una respuesta Th2 continúa sin resolverse. Se ha propuesto que las células epiteliales juegan un papel principal en este acondicionamiento bien produciendo citoquinas pro-alérgicas (IL-25, IL-33 o TSLP) o bien mediante la liberación de moléculas asociadas a daño celular, como ácido úrico o ATP (Lambrecht and Hammad, 2014). Una vez polarizadas, las células Th2 producen las citoquinas típicas de este tipo de respuestas (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13). Por medio de IL-4, las células T inducen el cambio isotípico de las inmunoglobulinas producidas por las células B, pasando a producir IgE. Estas IgE generan inmunocomplejos que activan las células del sistema inmune innato, como basófilos o mastocitos, induciendo su degranulación (Steinke and Borish, 2001). Además de su importancia respecto a la producción de IgE, las células B, al igual que las DCs, expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII), por lo que una vez activadas son capaces de sobre-expresar moléculas coestimuladoras y presentar antígenos a células T CD4⁺. La secreción de IL-5 e IL-9 promueve el reclutamiento de eosinófilos y mastocitos, respectivamente. La IL-13 actúa principalmente a nivel de células epiteliales induciendo la secreción de mucus,

la metaplasia de células caliciformes y la hipersensibilidad de las vías aéreas, además de participar en la remodelación del tejido induciendo la proliferación y diferenciación de miofibroblastos (Gour and Wills-Karp, 2015). Tal y como se describe, además de las células B, los basófilos, mastocitos y eosinófilos son células muy importantes para el inicio y la propagación de las reacciones alérgicas.

Basófilos

Los basófilos constituyen la fuente más importante de IL-4 durante las primeras fases de las respuestas Th2. Se originan en la médula ósea a partir de precursores CD34⁺ y una vez maduros salen a la circulación, donde suponen menos de un 1% de los leucocitos circulantes. Su vida media es únicamente de unos 2 días y tienen poca capacidad proliferativa (Stone et al., 2010).

Los basófilos expresan receptores para IgE en su membrana (FcεRI). Una vez se produce la unión de las IgE a sus receptores se produce cross-linking, lo cual lleva a su activación y consecuente liberación de mediadores. Los mediadores secretados por los basófilos se pueden dividir en aquellos que se encuentran preformados en los gránulos, los sintetizados *de novo* y las citoquinas/quimioquinas. El principal mediador que almacenan los basófilos en sus gránulos es la histamina (Lichtenstein et al., 1978), ésta actúa como vasodilatador, promoviendo el flujo sanguíneo a los tejidos. Además, los basófilos pueden producir rápidamente mediadores lipídicos tras su activación. Los más importantes son los cisteinil-leucotrienos, los cuales son potentes broncoconstrictores y aumentan la permeabilidad vascular. Finalmente, entre las citoquinas expresadas por los basófilos activados destaca IL-4 (Seder et al., 1991), además de IL-13 y GM-CSF, esta última actúa como potente factor de crecimiento, induciendo la diferenciación de granulocitos y monocitos en la médula ósea.

Mastocitos

Los mastocitos se originan a partir de progenitores de médula CD34⁺, salen a la circulación de forma inmadura, y maduran una vez colonizan los tejidos en contacto con los fibroblastos, las células estromales y las células endoteliales. Al igual que los basófilos, se activan por cross-linking de los FcεRI y secretan mediadores preformados, sintetizados *de novo* y citoquinas/quimioquinas (Gordon et al., 1990). Entre los mediadores preformados encontramos histamina (Riley and West, 1953), triptasa (activa los fibroblastos, promueve el reclutamiento de células inflamatorias y potencia el efecto broncoconstrictor de la histamina) y carboxipeptidasa A (metaloproteasa implicada en procesos de reparación). Tras su activación sintetizan cisteinil-leucotrienos (Lundstrom et al., 2012). Por último, cabe destacar que TNF-α se encuentra preformada y además comienza a sintetizarse *de novo* tras la activación de los mastocitos (Gordon and Galli, 1990). Sus funciones incluyen la inducción de moléculas de adhesión en células endoteliales y epiteliales. Otras citoquinas producidas por los mastocitos son IL-3, GM-CSF e IL5, las cuales son críticas para el desarrollo y la supervivencia de los eosinófilos (Stone et al., 2010).

Eosinófilos

Los eosinófilos desempeñan un papel principal durante la patogénesis del asma; tanto es así que el porcentaje y el número de eosinófilos, tanto en el lavado bronqueoalveolar como en el pulmón, se puede utilizar como medida del grado de la respuesta alérgica. Los eosinófilos se generan en la médula ósea a partir de precursores CD34⁺, bajo la influencia de IL-3 y GM-CSF en una primera fase y de IL-5 en una segunda fase (Denburg, 1998). Representan menos de un 5% de las células en sangre y su reclutamiento desde la sangre a los tejidos puede ocurrir bajo numerosas condiciones, aunque generalmente se relacionan con respuestas Th2. Además del tráfico de eosinófilos maduros desde la médula hasta el pulmón, también se ha propuesto la migración de precursores inmaduros CD34⁺, los cuales proliferarían *in situ* durante una reacción alérgica (Radinger et al. 2010).

Su activación puede darse tanto por IgG o IgA, como por IL-3, IL-5 o GM-CSF y lleva consigo la liberación de productos preformados y formados *de novo*. La proteína mayoritaria que encontramos en los gránulos preformados es la MBP (*major basic protein*). Se trata de una proteína sin actividad enzimática pero con alta toxicidad derivada de su capacidad para desestabilizar las membranas celulares mediante un mecanismo iniciado por un aumento de la permeabilidad de la membrana a iones (Kleine et al., 1998). Al igual que basófilos y mastocitos, los eosinófilos también son capaces de producir mediadores lipídicos como los cisteinil-leucotrienos. Los eosinófilos secretan un amplio abanico de citoquinas y quimioquinas, entre las que se encuentran TGF- β , IL-4, IL-5, TNF- α o CCL5.

La gravedad y persistencia de la inflamación alérgica en el pulmón se debe en gran parte a la acumulación de eosinófilos en el tejido pulmonar y en las vías aéreas. Numerosos estudios sugieren que durante la reacción alérgica, la apoptosis de los eosinófilos se ve retardada (Kankaanranta et al., 2005), por lo que entender el mecanismo de muerte programada de los eosinófilos resulta crítico para la patología de las reacciones alérgicas. Siglec-F es una proteína de unión a glicanos, homólogo de Siglec-8 en humanos, expresada en los macrófagos alveolares y en los eosinófilos de ratón, que induce apoptosis tras la unión a su ligando. Los ligandos endógenos de Siglec-F son las glicoproteínas expresadas por las células epiteliales bronquiales, Muc4 y Muc5b (Kiwamoto et al., 2014). Los eosinófilos apoptóticos son fagocitados en el lumen pulmonar por los macrófagos alveolares sin inducir inflamación adicional (Walsh, 2013).

Inducción de la respuesta alérgica frente a HDM

Una reacción alérgica en las vías aéreas puede ser provocada por distintos alérgenos como los ácaros del polvo o el polen. El modelo experimental más utilizado en la actualidad para la inducción de alergia frente a los ácaros del polvo, se basa en el empleo de extractos de HDM (*House Dust Mite*). Trabajar con extractos de ácaros cultivados implica que, además del ácaro en sí, pueden contener otros ligandos de PRR (receptores de reconocimiento de patrones) como lipopolisacárido (LPS) o β -glucanos (Gregory and Lloyd, 2011). En concreto, el extracto comercial que empleamos es de la especie *Dermatophagoides pteronyssinus* y los alérgenos principales que contiene se detallan en la [Tabla 1](#). Los más importantes son Der p1 y Der p2. Der p1, es una cistein-proteasa que

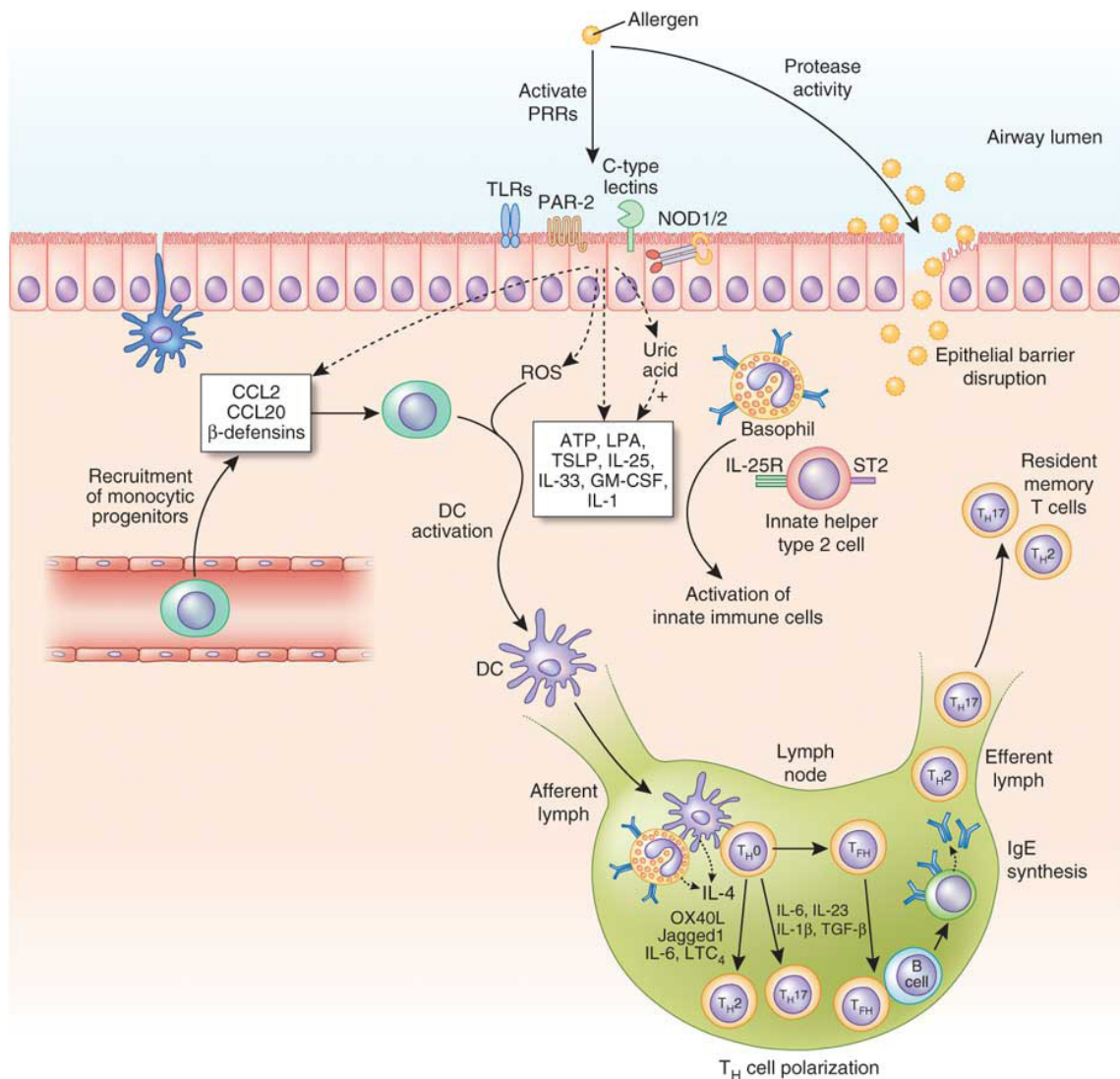
distorsiona las uniones intercelulares de la mucosa respiratoria, permitiendo de este modo el acceso del antígeno a las células del sistema inmune (Barrett et al., 2009). Der p2 por su parte, es un homólogo estructural del adaptador MD2, el cual es requerido para la unión de LPS a TLR4. Esta característica es de especial importancia para la activación de las células epiteliales, ya que expresan TLR4 pero muy bajos niveles de MD-2; de este modo, Der p2 podrá unirse a TLR4 y activar la cascada de señalización (Trompette et al., 2009).

Tabla 1. Alérgenos presentes en los extractos de HDM.

Alergeno	Función biológica	kDa	Consecuencia funcional
Der p 1	Cistein proteasa (tipo papaina)	24	Desestabilización de las uniones estrechas. Activación y producción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Degranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y producción de colágeno. Proliferación del músculo liso.
Der p 2	Reconocimiento de lípidos (relacionado con MD-2)	15	Mimetiza molecularmente a MD-2: presenta el LPS a TLR4 activando genes inflamatorios
Der p 3	Serin proteasa (tripsina)	31	Desestabilización de las uniones estrechas.
Der p 4	α -amilasa	60	
Der p 5	α -hélice de función desconocida	14	Se piensa que une ligandos hidrofóbicos y activa el sistema inmune innato
Der p 6	Serin proteasa (quimotripsina)	25	Desestabilización de las uniones estrechas. Activación y producción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Degranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y producción de colágeno. Proliferación del músculo liso.
Der p 7	Homólogo estructural de moléculas de unión a lípidos (Se une a polimixina-B)	30	No se une específicamente al LPS pero sí a otros lípidos bacterianos. Interacciona con el sistema inmune innato.
Der p 8	Glutathion S-transferasa	27	
Der p 9	Serin proteasa colagenolítica	29	Desestabilización de las uniones estrechas. Activación y producción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Degranulación de eosinófilos y mastocitos. Maduración de fibroblastos y producción de colágeno. Proliferación del músculo liso.
Der p 10	Tropomiosina	36	
Der p 11	Paramiosina	103	
Der p 12	Quitinasa (sin dominio catalítico)		
Der p 13	Transportador de lípidos		
Der p 14	Apolipoforina	177	Secreción de IL-4 e IL-13 por células sanguíneas mononucleadas
Der p 15	Quitinasa		
Der p 18	Quitinasa		
Der p 20	Quitin-arginasa		

Durante una respuesta alérgica frente al HDM, se desencadena una reacción compleja (Figura 2). El HDM, por un lado, activa numerosos PRRs en células epiteliales, induciéndose la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno), de señales de daño como ATP o ácido úrico, así como de TSLP y GM-CSF (citoquinas activadoras de células dendríticas) y varias interleuquinas, incluyendo miembros de la familia de IL-1. Por otro lado, debido a la actividad proteasa que poseen algunos de los alérgenos presentes en el HDM, éste también actúa directamente activando las células del sistema inmune, al romper las uniones estrechas entre las células epiteliales y acceder al parénquima pulmonar. De este modo, se crea un entorno inflamatorio que se traduce en el reclutamiento y la activación de células del sistema inmune como basófilos, células linfoides innatas (ILCs – *Innate Lymphoid Cells*) y monocitos. Los monocitos se reclutan por medio de CCL2 y CCL20; una vez en el parénquima pulmonar se diferencian en DCs inflamatorias. Éstas y otras DCs presentes en el parénquima pulmonar pueden migrar a los ganglios linfáticos,

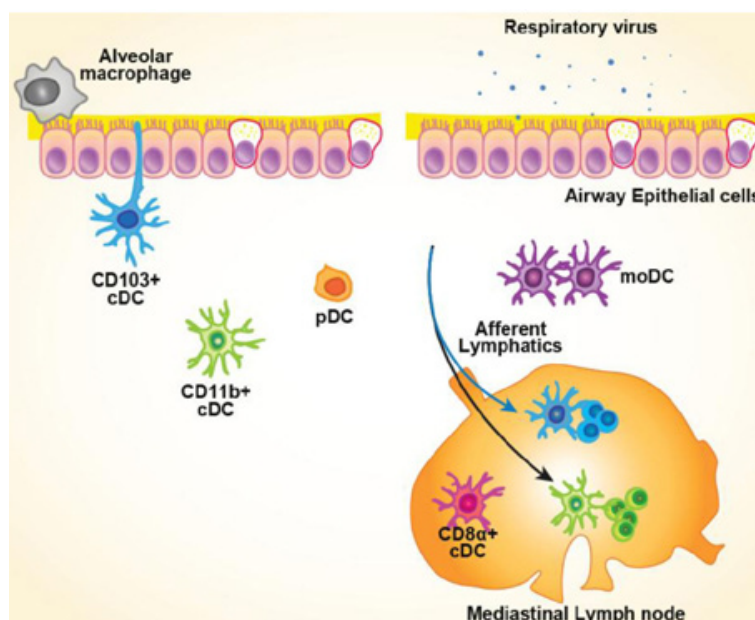
donde interaccionan con las células T para inducir su diferenciación en células Th2, Th17 o Tfh (*T follicular helper*) (Lambrecht and Hammad, 2012). Las dos primeras categorías se distribuirán de manera sistémica en forma de células T de memoria, mientras que el último subtipo es el encargado de promover la diferenciación de células B y, por lo tanto, la síntesis de IgE.



Lambrecht BN. & Hammad H. (2012), *Nature Medicine*

Figura 2. Esquema de una reacción alérgica frente a HDM en el pulmón. El HDM activa numerosos receptores de las células epiteliales pulmonares, induciéndose la producción de ROS, de señales de daño como ATP o ácido úrico, así como de TSLP y GM-CSF y varias interleuquinas. Por otro lado, es capaz de romper las uniones estrechas entre las células epiteliales accediendo al parénquima pulmonar debido a la actividad proteasa que poseen algunos de los alérgenos presentes en el HDM. De este modo, actúa directamente sobre las células del sistema del sistema inmune. Basófilos, ILCs o monocitos son inmediatamente reclutados y posteriormente activados. Los monocitos se reclutan por medio de CCL2 y CCL20, una vez en el parénquima pulmonar se diferencian en DCs inflamatorias, se activan y pueden migrar a los ganglios linfáticos donde interactúan con las células T para inducir su diferenciación a células Th2, Th17 o Tfh (*T follicular helper*). Las dos primeras categorías se distribuirán de manera sistémica en forma de células T de memoria, mientras que el último subtipo es el encargado de promover la diferenciación de células B y por lo tanto, la síntesis de IgE.

El pulmón está constantemente expuesto a antígenos y patógenos ambientales. Por esta razón, necesita estar equipado con una densa red de células inmunes capaces de discriminar entre antígenos perjudiciales y antígenos inocuos, y en consecuencia desarrollar una respuesta o inducir tolerancia local o sistémica. Datos recientes han puesto de manifiesto que la inducción y la regulación de las respuestas alérgicas está en gran parte controlada por el sistema monocítico-DC-macrofágico. En este sentido, en el pulmón en reposo se ha descrito la existencia de ambos tipos de monocitos, Ly-6C^{hi} y Ly-6C^{lo}. Respecto a las poblaciones de células dendríticas pulmonares, existen células dendríticas convencionales (cDCs), células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) reclutados *de novo* en el momento en que se desencadena el proceso inflamatorio. En cuanto a los macrófagos, la población mayoritaria la constituyen los macrófagos alveolares (AMØs), aunque también existen los macrófagos intersticiales (iMØs) localizados en el parénquima pulmonar (Figura 3).



Kim, TH. et al. (2014), *Immune Network*

Figura 3. Sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar. Los AMØs se localizan en el espacio alveolar. En una situación de reposo, las cDCs CD103⁺ se localizan en el parénquima pulmonar, concretamente bajo la capa epitelial de los conductos aéreos, mientras que las cDCs CD11b⁺ y las pDCs las encontramos en la lamina propia pulmonar. En una situación inflamatoria, por un lado se reclutan monocitos que se diferencian a moDCs, y por otro lado, las cDCs CD103⁺ y CD11b⁺ migran al ganglio mediastinal para estimular a las células T.

Origen de las poblaciones de monocitos y DCs

La hematopoyesis adulta tiene lugar en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas (**HSCs**, *hematopoietic stem cells*). Estas HSCs dan lugar a diferentes precursores en la médula ósea que progresivamente van restringiéndose a los distintos linajes hematopoyéticos (Figura 4). La divergencia entre linaje mieloide y linfoide es un proceso muy temprano durante la hematopoyesis: el precursor común mieloide (**CMP**)

puede dar lugar a eritrocitos, granulocitos, monocitos, macrófagos y megacariocitos (Akashi et al., 2000), mientras que el precursor común linfoide (**CLP**) puede dar lugar a células B, células T y células NK (Kondo et al., 2001). Posteriormente, se identificó un precursor mieloide residente en la médula ósea, que había perdido su potencial para generar eritrocitos, granulocitos y megacariocitos, pero que conservaba la capacidad para diferenciarse en monocitos, macrófagos y DCs. Este precursor que tenía alta capacidad proliferativa, fue denominado precursor común de macrófagos y DCs (**MDP**) (Auffray et al., 2009a; Fogg et al., 2006). A continuación, se describió un nuevo progenitor residente en la médula ósea capaz de generar cDCs y pDCs tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no monocitos ni macrófagos; este precursor también presentaba alta tasa proliferativa y se denominó precursor común de DCs (**CDP**) (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). Finalmente, se caracterizó el precursor de las cDCs por primera vez en el bazo. Este progenitor, al que se llamó **pre-DC**, proviene de un CDP que ha perdido su potencial para diferenciarse a pDC, se genera en la médula ósea y migran a través de la sangre hasta los tejidos donde se diferencian en las distintas poblaciones de cDCs (Liu et al., 2009) (Figura 4).

Las pDCs, a diferencia del resto de subpoblaciones de DCs, se originan en la médula ósea en reposo a partir un CDP y migran a través de la sangre hasta los tejidos ya de forma diferenciada (Figura 4). Sin embargo, se ha propuesto la posibilidad de que durante un proceso inflamatorio puedan ser reclutados precursores específicos de pDCs a los órganos linfoides que se diferencien localmente (Shortman and Naik, 2007).

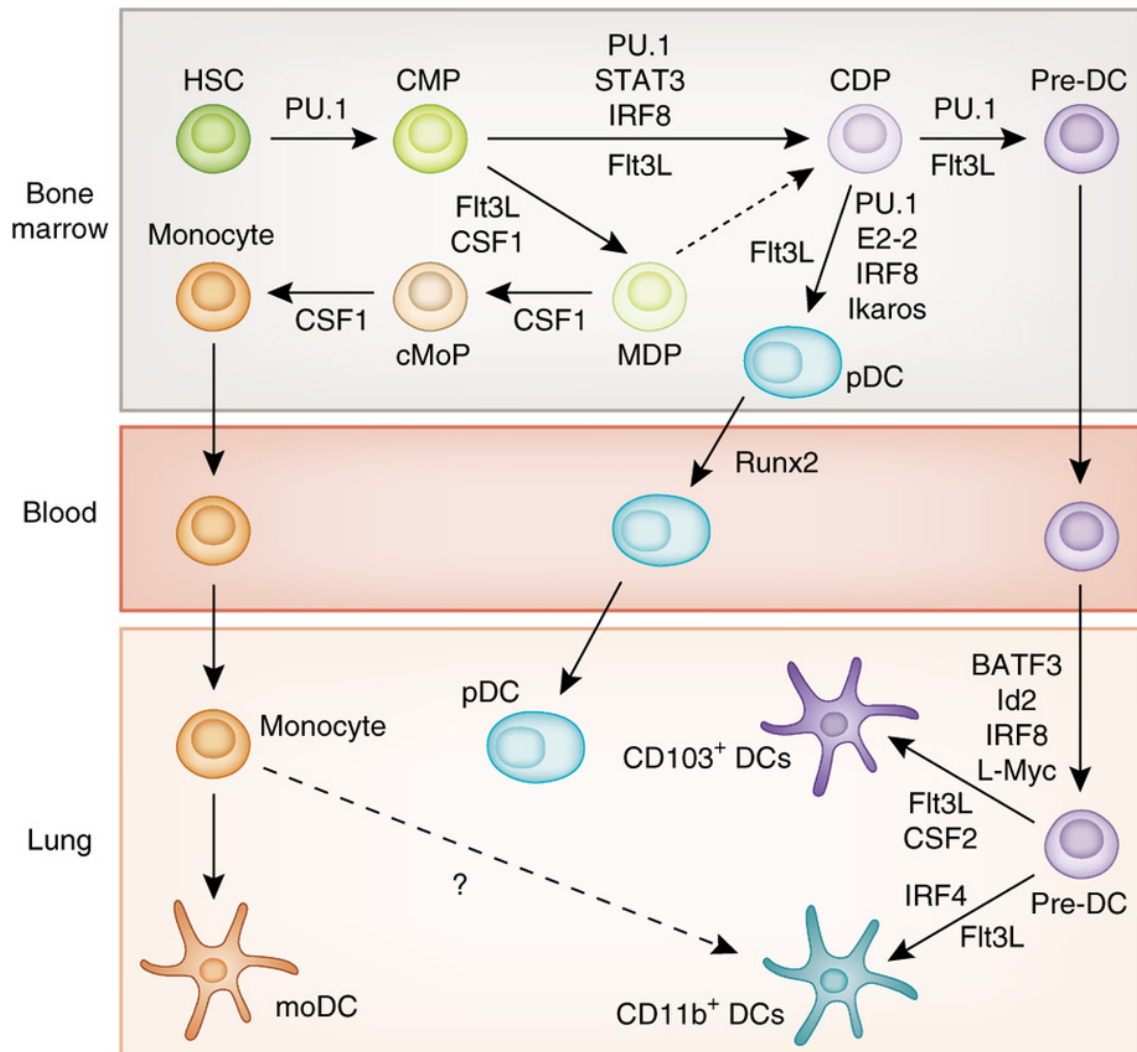
Finalmente, los monocitos se generan en la médula ósea a partir del recientemente descubierto **cMoP** (precursor común de monocitos), que se genera a partir del MDP y da lugar a monocitos maduros (Hettinger et al., 2013) (Figura 4).

Monocitos

Los monocitos son leucocitos circulantes que desempeñan importantes funciones durante las respuestas inflamatorias. Una vez diferenciados en la médula ósea, se incorporan a la circulación sanguínea por un proceso dependiente del receptor de quimioquinas CCR2. Sin embargo, los monocitos no se encuentran únicamente en la circulación, sino que se han descrito también en el bazo (Swirski et al., 2009), el intestino (Bain et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012), la piel (Tamoutounour et al., 2013) y los pulmones (Jakubzick et al., 2013). Durante situaciones inflamatorias, los monocitos se reclutan a los tejidos en los que pueden diferenciarse en MØs o DCs inflamatorias (Rivollier et al., 2012).

En ratón, se han descrito dos subpoblaciones de monocitos descritas en base a la expresión del marcador Ly-6C: monocitos Ly-6C^{hi} y monocitos Ly6C^{lo}. Los primeros son los denominados clásicos o inflamatorios y tienen una vida media corta (20 h), mientras que los segundos tienen una vida media más larga (2,2 días) y se encuentran en el lumen de los vasos sanguíneos desarrollando funciones de vigilancia y reparación del endotelio (Geissmann et al., 2010; Yona et al., 2013).

Los **monocitos Ly-6C^{hi}** tienen el siguiente fenotipo: CD11b^{hi}, CCR2⁺, Cx₃CR1^{lo}, CD11c⁻, L-selectina⁺ y CCR5⁻. Representan entre el 2-5% de los leucocitos circulantes y son rápidamente movilizados a los sitios de inflamación de manera dependiente de



Kopf M. et al. (2014), *Nature Immunology*

Figura 4. Origen de los monocitos y las células dendríticas pulmonares. En la médula ósea, las HSCs dan lugar a los CMPs de manera dependiente de PU.1. Los CMPs generan CDPs o MDPs. Por un lado, los CDPs dan lugar a las pre-DCs, que migran a través de la sangre hasta el pulmón, donde se diferencian en las distintas poblaciones de cDCs, y por el otro a las pDCs. Los MDPs, por su parte, generan monocitos mediante un intermedio de cMoP; estos monocitos salen a la circulación y se extravasan al pulmón generando moDCs. **HSCs:** células madre hematopoyéticas; **CMP:** precursor común mieloide; **CDP:** precursor común de DCs; **MDP:** precursor común de macrófagos y DCs; **pre-DC:** precursor de cDCs; **cMoP:** precursor común de monocitos.

CCR2, donde, en respuesta a factores locales, citoquinas pro-inflamatorias y estímulos microbianos, pueden diferenciarse en MØs o DCs inflamatorias (Ginhoux and Jung, 2014).

Los **monocitos Ly-6C^{lo}** tienen el siguiente fenotipo: CD11b^{hi}, CCR2⁻, Cx₃CR1⁺, CD11c^{int}, L-selectina⁻ y CCR5⁺ y son igual de abundantes en sangre que los monocitos Ly-6C^{hi} (Auffray et al., 2009b). Estudios de microscopía intravital han revelado que su función en estado de reposo es migrar por la zona luminal de los vasos sanguíneos asociados al endotelio vascular, proceso conocido como *patrolling*. Durante situaciones inflamatorias se ha descrito que tienen capacidad para diferenciarse a MØs anti-inflamatorios (Auffray et al.,

2007) y desarrollar tareas de reparación del endotelio dañado (Carlin et al., 2013).

El origen de esta población ha sido controvertido durante muchos años, defendiéndose por un lado que derivaba de MDPs independientemente de los monocitos Ly-6C^{hi} (Geissmann et al., 2003; Hanna et al., 2011) y por el otro, que se originaba a partir de los monocitos Ly-6C^{hi} (Nahrendorf et al., 2007; Sunderkotter et al., 2004; Varol et al., 2007). Estudios recientes realizados en condiciones no inflamatorias establecen que los monocitos Ly-6C^{hi} constituyen un precursor obligatorio para los monocitos Ly-6C^{lo} (Hettinger et al., 2013; Yona et al., 2013) y que la reducción en el número de monocitos Ly-6C^{hi} conlleva un incremento en los niveles M-CSF disponible, aumentando la vida media de los monocitos Ly-6C^{lo} (Yona et al., 2013). Esta es la razón por la cual en modelos en los que el número de monocitos Ly-6C^{hi} está disminuido, el número de monocitos Ly-6C^{lo} no se vea gravemente afectado (Qu et al., 2004).

Monocitos pulmonares

Datos recientes han puesto de manifiesto que en la extensa red capilar que irriga el parénquima pulmonar existen monocitos localizados en los compartimentos intra y extra-vascular, o incluso, ambos a la vez (Rodero et al., 2015). De este modo, no existen datos concluyentes sobre el porcentaje de monocitos Ly-6C^{hi} y monocitos Ly-6C^{lo} que se encuentran realmente en el parénquima pulmonar y los que se encuentran en los capilares.

Se ha descrito la existencia de monocitos Ly-6C^{hi} en los pulmones en reposo y que estos monocitos pueden migrar desde el pulmón a los ganglios sin perder su identidad monocítica (Jakubzick et al., 2013). Durante un proceso inflamatorio, existen datos controvertidos acerca la población resultante tras la diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} pulmonares. Generalmente se les ha llamado de una forma o de otra en base a su fenotipo, morfología y función, sin embargo esta división en ocasiones resulta un tanto arbitraria, es por esto que se ha propuesto englobar a todas las células derivadas de monocitos bajo el término MC (*Monocyte-derived cell*) (Guilliams et al., 2014; Scott et al., 2014).

Células dendríticas

Las células dendríticas fueron descubiertas en 1973 por Ralph Steinman (Steinman and Cohn, 1973). Son células presentadoras de antígeno profesionales que constituyen el nexo entre la inmunidad innata y adaptativa. Se trata de una población muy heterogénea y distintos subtipos presentan fenotipos y propiedades funcionales muy diferentes.

Células dendríticas convencionales

Las cDCs son células especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos a células T. Se las puede sub-clasificar en migratorias y residentes, en base a su localización en los tejidos. Las cDCs migratorias se generan en los tejidos periféricos donde actúan como centinelas. Tienen capacidad para migrar desde los tejidos periféricos hasta los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos, tránsito que se ve favorecido durante una situación inflamatoria (Said and Weindl, 2015). Las cDCs migratorias se pueden dividir a su vez en cDCs CD11b⁺ y cDCs CD103⁺. La segunda categoría de cDCs la constituyen las cDCs residentes en los tejidos linfoides, que se localizan en los órganos

linfoides principales como los ganglios, el bazo, el timo, el BALT y el GALT. Del mismo modo, las cDCs residentes se pueden clasificar en cDCs CD11b⁺ y cDCs CD8⁺.

A pesar de las diferencias fenotípicas, las cDCs migratorias CD103⁺ y las cDCs residentes CD8⁺ se regulan por los mismos factores de transcripción durante su desarrollo y poseen funciones similares. Los factores necesarios para su diferenciación son IRF8 (*interferon regulatory factor 8*), ID2 (*inhibitor of DNA binding 2*) y BAFT3 (*basic leucine zipper transcription factor 3*). Tanto las cDCs CD103⁺ como las cDCs CD8⁺ se caracterizan por su habilidad para captar y procesar antígenos extracelulares y presentarlos en el contexto de MHCI (den Haan et al., 2000) a células T CD8⁺ citotóxicas (cross-presentation) (Allan et al., 2003). La cross-presentación permite a las DCs generar respuestas citotóxicas frente a tumores o virus. El hecho de que las cDCs CD103⁺ y las cDCs CD8⁺ sean más eficaces en presentar antígenos en el contexto de MHCI a células T CD8⁺ tiene que ver con los mecanismos de captación del antígeno, su compartimento endocítico y la expresión de moléculas de MHCI (Joffre et al., 2012).

Las cDCs CD11b⁺, tanto migratorias como residentes, necesitan el factor de transcripción IRF4 durante su desarrollo (Allenspach et al., 2008; Joffre et al., 2012).

Células dendríticas plasmacitoides

Las pDCs se encuentran en la médula ósea, timo, sangre y todos los órganos linfoides periféricos en reposo, y se reclutan rápidamente durante una situación inflamatoria (Haniffa et al., 2013). Son células especializadas en la rápida y masiva producción de IFN-I en respuesta a ácidos nucleicos exógenos (Reizis et al., 2012). Se caracterizan por la expresión de Ly-6C, B220 o Siglec-H.

Las pDCs expresan altos niveles de TLR7 y TLR9 (TLR – Toll Like Receptor), especializados en el reconocimiento de ssRNA y ssDNA respectivamente, por lo que se activan tras detectar ácidos nucleicos propios o virales. Son capaces de presentar y cross-presentar antígenos induciendo una respuesta Th1 (Haniffa et al., 2013). Fallos en la capacidad de las pDCs para mantener la tolerancia frente a ácidos nucleicos propios están ligados a enfermedades autoinmunes como el lupus o la psoriasis (Gilliet and Lande, 2008).

Células dendríticas derivadas de monocitos

Estudios realizados durante infecciones, tanto crónicas como agudas, causadas por virus, bacterias y parásitos han demostrado que se produce un incremento en el número de DCs. Estas DCs incluyen tanto cDCs como moDCs, ya que en situaciones de inflamación los monocitos Ly-6C^{hi} circulantes pueden extravasarse a los tejidos y diferenciarse en el sitio de infección en células que poseen características fenotípicas y funcionales de una célula dendrítica (Leon and Ardavin, 2008).

La correcta separación de las moDCs y las cDCs CD11b⁺ durante una situación inflamatoria no ha sido fácil, debido a que comparten muchos marcadores. Para discriminar ambos tipos de DCs se han empleado diferentes estrategias basadas en la expresión de Ly-6C, marcador típico del linaje monocítico (Leon et al., 2007); CD14, marcador que identifica los monocitos en el sistema humano (Nakano et al., 2012a); CD88, que

corresponde al receptor de complemento C5a (Nakano et al., 2015); o CD64, receptor de IgG de alta afinidad (Plantinga et al., 2013). Las moDCs son positivas para todos ellos, aunque, actualmente, la combinación FcεRI-CD64 es la más empleada para la correcta identificación de las moDCs (Plantinga et al., 2013).

Células dendríticas pulmonares

Las DCs pulmonares pueden encontrarse tanto en el parénquima pulmonar como en el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT).

El BALT es un tejido linfoide secundario asociado a mucosas que se localiza rodeando las grandes vías aéreas (Sminia et al., 1989). Estas estructuras organizadas pueden estar presentes constitutivamente o inducirse en respuesta a agentes microbianos u otro tipo de inflamaciones pulmonares (Randall, 2010; Tschernig and Pabst, 2000). Al tratarse de un tejido linfoide muy ligado al parénquima pulmonar, en el BALT coexisten cDCs residentes CD11b⁺ CD8⁻ y CD11b⁻ CD8⁺ y cDCs migratorias CD11b⁺ CD103⁻ y CD11b⁻ CD103⁺. Hoy en día no existen aproximaciones experimentales capaces de abordar en detalle la contribución de las DCs del BALT y las DCs del parénquima al conjunto de las DCs pulmonares.

Las cDCs presentes en el parénquima pulmonar, una vez que captan el antígeno en el pulmón, migran al ganglio linfático drenante por los vasos linfáticos para estimular las células T e iniciar la respuesta inmune (Kopf et al., 2015). Las cDCs CD103⁺ se encuentran formando una red bajo la capa epitelial de los conductos aéreos, mientras que las cDCs CD11b⁺ las encontramos en la lamina propria pulmonar, justo por debajo de la membrana basal (Lambrecht and Hammad, 2012).

En el pulmón, las **cDCs CD103⁺** están principalmente implicadas en respuestas frente a virus, son las principales encargadas de captar el virus en el pulmón y de transportarlo hasta los ganglios mediastinales para iniciar una respuesta T CD4⁺ o CD8⁺ específica (GeurtsvanKessel et al., 2008). Por otro lado, se les ha atribuido también un papel en respuestas Th2 frente a HDM (Nakano et al., 2012b).

Respecto a la función de las **cDCs CD11b⁺** existen trabajos que les atribuyen una función frente a infecciones bacterianas como a *Mycobacterium tuberculosis* (Wolf et al., 2007). Sin embargo, en estos trabajos, la caracterización de las poblaciones resultaba deficiente, al no existir un marcador específico que distinguiera las cDCs CD11b⁺ de las moDCs. Durante un proceso alérgico inducido por HDM, se ha propuesto que las cDCs CD11b⁺ eran las células encargadas de transportar el antígeno hasta los ganglios e iniciar la respuesta (Plantinga et al., 2013). Posteriormente, en un modelo de alergia frente a *Blomia tropicalis* se propuso GM-CSF como la molécula responsable del acondicionamiento de las cDCs CD11b⁺ para la inducción de respuestas Th2 (Zhou et al., 2014).

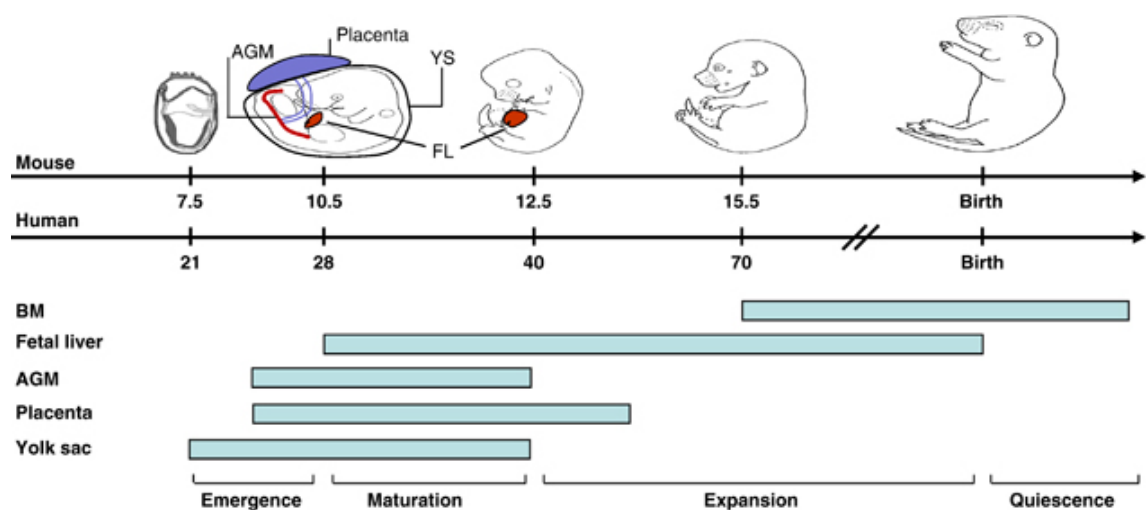
El número de **moDCs** en el pulmón en situaciones no inflamatorias es muy reducido pero se ven sustancialmente incrementadas en respuestas frente a virus (Lin et al., 2008; Seo et al., 2011), bacterias (Peters et al., 2001; Schreiber et al., 2011) y durante la respuesta alérgica (Plantinga et al., 2013). En este último estudio, realizado en un modelo de alergia frente a HDM, se demostró que las moDCs tenían poca capacidad migratoria hacia el ganglio mediastinal, y que actuaban promoviendo la inflamación a nivel local en el

parénquima pulmonar. Esto era posible gracias a su capacidad para producir quimioquinas que actuaban directamente en el reclutamiento de eosinófilos, monocitos y de células Th2 efectoras al pulmón (CCL2, CCL4, CCL7, CCL9, CCL12 y CCL24).

Macrófagos

En el siglo XIX, Metchnikoff identificó los primeros fagocitos profesionales a los que denominó MØs (en griego, “gran comedor”). Actualmente se les reconocen funciones inmunológicas innatas en respuesta a patógenos, además de contribuir al mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y su reparación (Wynn et al., 2013). En un principio se consideró que los MØs derivaban de monocitos circulantes, los cuales se generan en la médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que muchos macrófagos residentes de tejido, como la microglia o los AMØs, se generan en etapas anteriores al nacimiento, a partir de precursores embrionarios y que dichos MØs se mantienen en el tejido adulto por proliferación (Ginhoux and Jung, 2014).

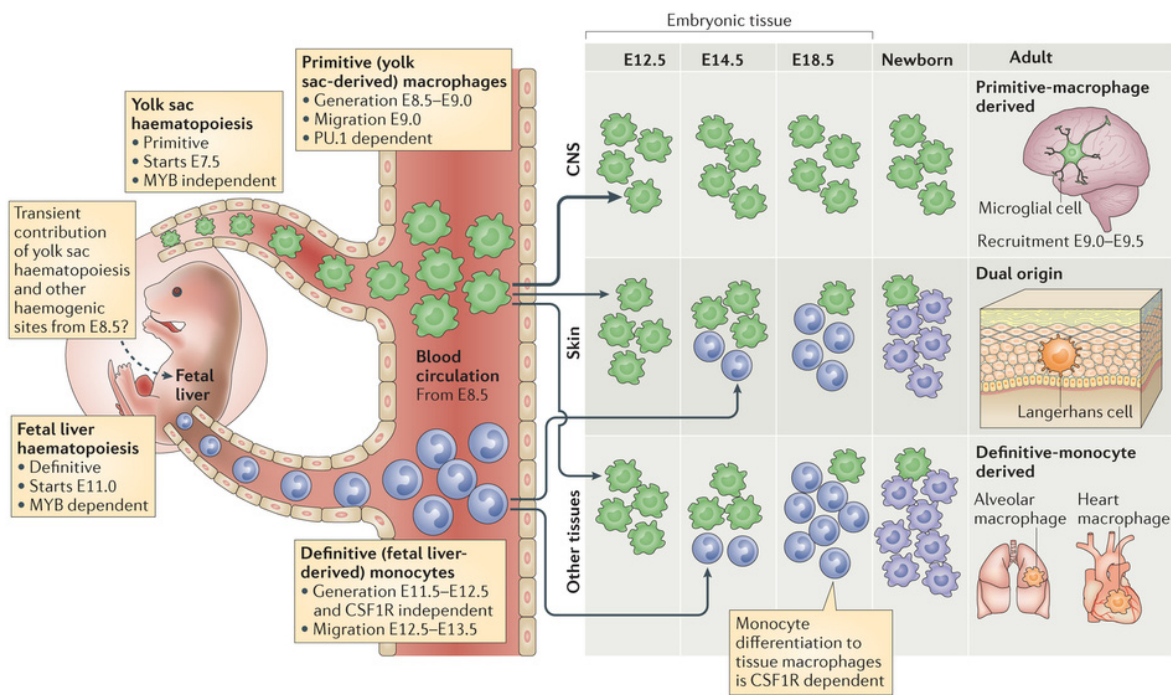
La hematopoyesis tiene lugar en varias oleadas durante el desarrollo embrionario (Figura 5). La primera oleada tiene lugar en los islotes extraembrionarios del saco vitelino (día 7 de gestación - E7) y está principalmente orientada a la producción de eritrocitos nucleados primitivos (Cumano and Godin, 2007), aunque también se ha detectado la existencia de progenitores mieloides anteriores al establecimiento de la circulación. Alrededor de E9.5 se desarrolla la región del AGM (aorta-gónada-mesonefros), donde se generan las HSCs que darán lugar a progenitores que colonizarán el hígado fetal (E10.5). El hígado fetal representa el órgano hematopoyético principal durante el desarrollo embrionario hasta el desarrollo de la médula ósea, y el inicio de la hematopoyesis adulta.



Luis, TC. et al. (2012), *Leukemia*

Figura 5. Hematopoyesis embrionaria en ratón. En un primer momento, la hematopoyesis tiene lugar en los islotes extraembrionarios del saco vitelino (E7). Alrededor de E9.5 se desarrolla la aorta-gónada-mesonefros y en ésta se generan las HSCs. Cuando las HSCs colonizan el hígado fetal (E10.5), éste se convierte en el órgano hematopoyético principal durante el desarrollo embrionario hasta el desarrollo de la médula ósea. Las barras representan el momento en el que los centros hematopoyéticos son activos. **AGM**: aorta-gónada-mesonefros; **BM**: médula ósea; **FL**: hígado fetal; **YS**: saco vitelino.

Los MØs primitivos que se generan en el saco vitelino se expanden y colonizan todos los tejidos embrionarios (Ginhoux et al., 2010; Takahashi and Naito, 1993) (Figura 6). Paralelamente, las HSCs generadas en la región del AGM alcanzan el hígado fetal. La hematopoyesis en el hígado fetal genera monocitos alrededor de E11.5-E12.5 y estos monocitos migran por la sangre hasta invadir el resto de los tejidos embrionarios. Una vez en los tejidos, los monocitos fetales proliferan y se diferencian en MØs (Hoeffel et al., 2012) (Figura 6). Estos dos mecanismos de generación de MØs coexisten en el tiempo, por lo que fue complicado definir si un tipo específico de MØs residente provenía de la hematopoyesis primitiva (saco vitelino) o de la definitiva (hígado fetal). Para resolver esto, se utilizó un modelo de ratón deficiente en c-Myb, un factor de transcripción imprescindible para la generación de las HSCs y por lo tanto para la hematopoyesis definitiva (Schulz et al., 2012). Estos resultados revelaron que las células de Langerhans (LCs) en la piel, las células de Kupffer en el hígado o la microglía eran independientes de las HSCs y por lo tanto, se originaban a partir de los MØs del saco vitelino.



Ginhoux F. & Jung S. (2014), *Nature Reviews Immunology*

Figura 6. Origen embrionario de los macrófagos residentes. Los precursores hematopoyéticos primitivos, generados durante la primera oleada de hematopoyesis en el saco vitelino, generan MØs primitivos que colonizan todos los tejidos embrionarios (E9-E10). Paralelamente, las HSCs comienzan a generarse en la aorta-gónada-mesonefros (E10.5) y colonizan el hígado fetal. La hematopoyesis en el hígado fetal genera monocitos alrededor de E11.5-E12.5, estos monocitos migran e invaden los tejidos embrionarios alrededor de E13.5-14.5. Una vez en los tejidos, los monocitos de hígado fetal proliferan y se diferencian a MØs, diluyendo así la población de MØs derivados del saco vitelino. La microglia es una excepción, los monocitos fetales no tienen acceso y por lo tanto, la microglia en el adulto proviene de MØs del saco vitelino.

En el caso del pulmón (Guilliams et al., 2013) y del corazón (Epelman et al., 2014), los MØs primitivos colonizan todos los tejidos embrionarios; sin embargo, una vez que los monocitos fetales entran en los tejidos, proliferan y se diferencian en MØs que diluyen la población de MØs derivados del saco vitelino. En el caso de la microglia sin embargo, los MØs derivan en su mayoría del saco vitelino (Ginhoux et al., 2010); se ha demostrado que una vez que se produce el cierre de la barrera hematoencefálica, alrededor de E13.5, los monocitos no son capaces de entrar, a no ser que ésta sufra una alteración debido a un proceso inflamatorio. Para otras poblaciones, como las LCs se propone una contribución dual entre estos dos tipos de hematopoyesis (Hoeffel et al., 2012); los derivados del saco vitelino colonizarán la piel durante los primeros estadios embrionarios y posteriormente lo harán los MØs derivados de monocitos fetales a partir de E.14.5.

Los MØs intestinales son una excepción a este dogma, ya que se ha demostrado que para su mantenimiento en reposo requieren de un continuo aporte de monocitos Ly-6C^{hi} (Bain et al., 2013). La generación de MØs intestinales maduros ocurre localmente mediante una serie de estadios intermedios en los que los monocitos pierden la expresión de Ly-6C, y regulan la expresión de F4/80, CX3CR1, CD11c y MHCII.

El origen de los MØs puede ser muy diferente en reposo y durante un proceso inflamatorio. Aunque su origen en homeostasis ha sido ampliamente estudiado, el panorama se complica durante una respuesta inflamatoria. Por esta razón, será necesario estudiar la regeneración de MØs residentes de diferentes tejidos durante distintos estímulos inflamatorios.

Macrófagos pulmonares

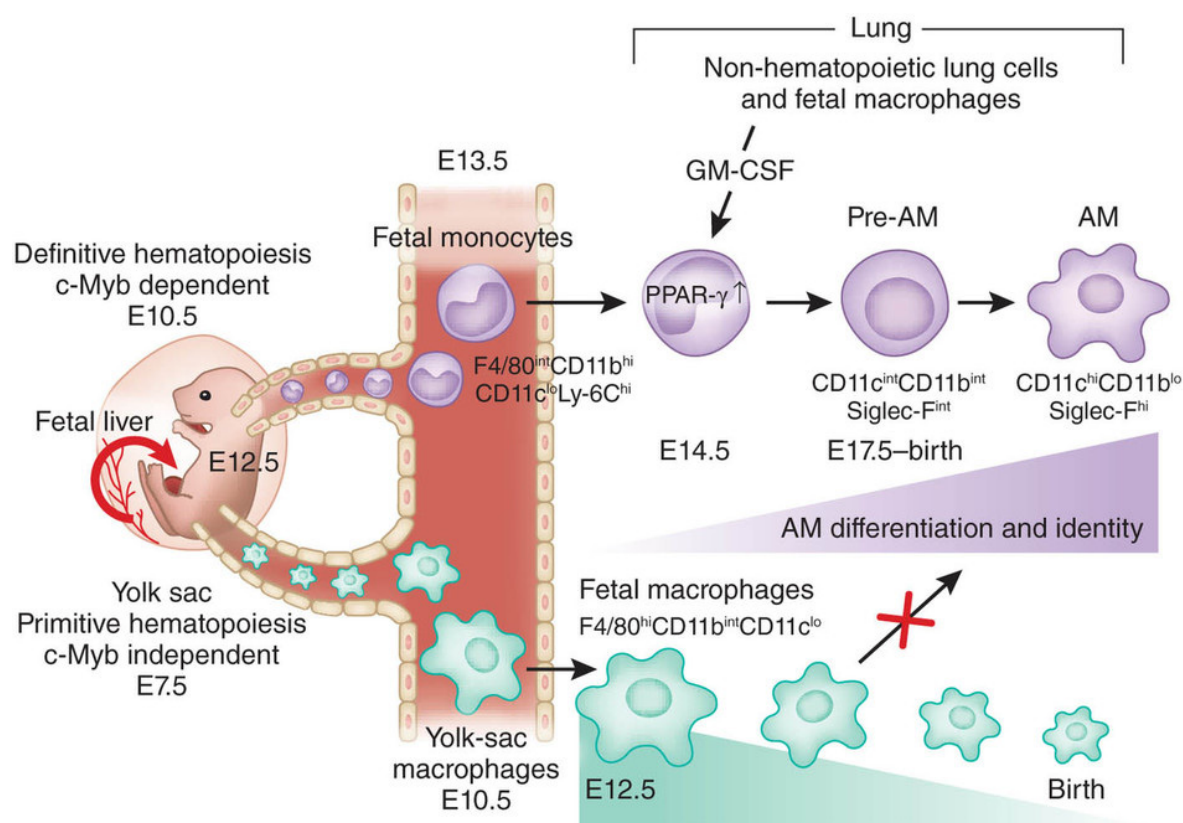
En el pulmón podemos hablar de dos tipos de MØs: una población mayoritaria que se encuentra en los espacios alveolares conocidos como MØs alveolares (AMØs), y una población minoritaria conocida como MØs intersticiales (iMØs) que reside en el parénquima pulmonar.

Macrófagos alveolares

Los AMØs son muy importantes para el mantenimiento de los niveles de surfactante y la fagocitosis de células muertas en los alvéolos (Lambrecht, 2006). Además, tienen un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmune pulmonar, ya que se encuentran en un estado anti-inflamatorio evitando así el daño o la activación de las células epiteliales (Hussell and Bell, 2014). Durante un proceso infeccioso se encargan de la fagocitosis de los patógenos y de las células dañadas para así recuperar la homeostasis pulmonar (MacLean et al., 1996).

Durante el desarrollo embrionario, los pulmones son colonizados secuencialmente por MØs derivados del saco vitelino y monocitos fetales. Estos últimos sustituirán a los MØs primitivos y se acumularán en el tejido pulmonar hasta el nacimiento, momento en el cual colonizarán los espacios alveolares dando lugar a los AMØs. El proceso de diferenciación de monocito fetal a AMØ requiere de la activación del factor de transcripción PPAR- γ por parte del GM-CSF secretado por las células epiteliales alveolares. Esto

ocurre a través de un estadio intermedio inmaduro conocido como pre-AMØ que existe durante los primeros días posteriores al nacimiento (Guilliams et al., 2013; Schneider et al., 2014) (Figura 7). Un reciente estudio ha utilizado diversas técnicas, entre ellas análisis de mapeo genético, parabiosis, depleción, quimeras irradiadas y diferentes estrategias de transferencia adoptiva, que han permitido confirmar que en reposo los AMØs se mantienen por proliferación. Aunque tienen una tasa de recambio muy lenta, la regeneración ocurre de forma independiente de monocitos (Hashimoto et al., 2013).



Ginhoux F. (2014), *Nature Immunology*

Figura 7. Origen embrionario de los macrófagos alveolares. Los pulmones son colonizados, en una primera oleada, por macrófagos del saco vitelino, y en un segundo momento por monocitos fetales. Una vez en los pulmones, los monocitos fetales proliferan y comienzan a diferenciarse en AMØs pasando por un intermedio de pre-AMØs (E17.5). La producción de GM-CSF por células no hematopoyéticas y MØs fetales inicia el programa de diferenciación en AMØs induciendo la expresión de PPAR-γ en los monocitos fetales. Los macrófagos derivados del saco vitelino no se diferencian en AMØs y se van diluyendo paulatinamente entre los AMØs derivados de monocitos fetales.

Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, el origen de los AMØs puede ser muy diferente en reposo y durante un proceso inflamatorio. Los primeros estudios que abordaron la regeneración de los AMØs utilizaron quimeras, se irradiaron los ratones con una dosis subletal, tras la cual mueren todas las células del sistema hematopoyético, y se reconstituyeron con células de médula ósea total de un donante congénito, de este modo, trazaron el origen de la nueva progenie. Utilizaron dos aproximaciones: irradiación del

cuerpo entero del ratón e irradiación protegiendo la caja torácica del animal con una carcasa de plomo. En el primer caso, los AMØs se remplazaron por células del donante, mientras que cuando protegieron la caja torácica, los macrófagos originales seguían existiendo un año después de la irradiación (Tarling and Coggle, 1982). Esto quiere decir que aunque los AMØs tienen capacidad para mantenerse durante largos periodos de tiempo, en situaciones concretas pueden ser repuestos por progenitores sanguíneos. Por otro lado, utilizando ratones CD11c-DTR, los cuales expresan el receptor de la toxina diftérica bajo el promotor de CD11c, concluyeron que los AMØs se regeneraban a partir de monocitos adultos mediante un paso intermedio de MØ pulmonar (Landsman and Jung, 2007).

Macrófagos intersticiales

Se trata de una población minoritaria, en comparación con los AMØs, sobre la cual no hay demasiados datos. En la literatura se definen como células CD11b^{int}, CD64^{hi}, MerTK^{hi}, MHCII^{hi}, CD11c^{int} (Bedoret et al., 2009; Jakubzick et al., 2013; Misharin et al., 2013). Inicialmente se propuso un origen dual, debido a que dicha población contenía células tanto de origen embrionario (MØs del saco vitelino) como monocitos adultos (Schulz et al., 2012). Sin embargo, la contribución de los monocitos adultos a esta población es todavía objeto de controversia, ya que estudios posteriores indicaron que no existía intercambio de iMØs en parabiosis y por lo tanto, que su origen era embrionario (Jakubzick et al., 2013).

Existen pocos trabajos destinados a abordar la función fisiológica de los iMØs. En concreto, durante un modelo de alergia frente a bajas concentraciones de LPS, endotoxina de las paredes bacterianas presente en numerosos alérgenos como los ácaros del polvo o el polen, se ha propuesto que ejercen un papel de regulación negativa sobre las moDCs durante el proceso alérgico (Bedoret et al., 2009).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la cinética de las distintas poblaciones de monocitos, células dendríticas y macrófagos pulmonares durante una reacción alérgica inducida por HDM. Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos concretos:

- I) Caracterización fenotípica de las poblaciones leucocitarias pulmonares en reposo.
- II) Dinámica de las poblaciones leucocitarias pulmonares durante la respuesta alérgica frente a HDM.
- III) Estudio de la contribución de los monocitos Ly-6C^{hi} a la generación de las poblaciones de células dendríticas y macrófagos pulmonares durante la alergia inducida por HDM.
- IV) Análisis de las variaciones sufridas por las poblaciones alveolares, macrófagos alveolares y eosinófilos, durante una respuesta alérgica inducida por HDM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Materiales biológicos

1.1 Ratones:

Los ratones de las cepas **C57BL/6** fueron suministrados por Charles River (L'Arbresle, Francia).

Los ratones **C57BL/6 CD45.1** y **OTII** fueron suministrados por Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Los ratones **CCR2^{-/-}** en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por el Dr. Frank Tacke del RWTH-University Hospital Aachen (Aachen, Alemania).

Los ratones **IFNAR^{-/-}** en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por el Dr. Ulrich Kalinke (Center for Experimental and Clinical Infection Research, Hannover, Alemania).

Los ratones **IL-1R α ^{-/-}** en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por la Dra. Isabelle Couillin (Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, Université d'Orleans, Francia).

Los ratones **NLRP3^{-/-}** en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por el Dr. Pablo Pelegrín (Instituto Murciano de Investigación Biomédica, Murcia, España)

Los animales han sido criados en las instalaciones del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Se utilizaron en la experimentación animales de edades comprendidas entre las 6 y las 10 semanas y se respetaron las recomendaciones europeas sobre ética, contempladas en la directiva europea 63/2010, durante los procesos de cría, manipulación y sacrificio.

2.- Reactivos

2.1 Medios de cultivo

Para el cultivo de los hibridomas, así como para los cultivos primarios de monocitos y de células totales de ganglios mediastinales, se utilizó RPMI-1640 con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, L-glutamina 2 µM, 2β-mercaptoetanol 50 µM y sodio piruvato 1mM, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, fetal bovine serum) de Harlan (Bicester, RU).

2.2 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) utilizados en este trabajo se encuentran

listados en la [Tabla 2](#). Algunos mAbs fueron purificados en un equipo Profinia (BioRad, CA, USA), utilizando columnas de proteína G-sefara a partir del sobrenadante del cultivo de los hibridomas; otros fueron adquiridos en su forma purificada o conjugados con biotina, isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), aloficocianina (APC), peridina de clorofila-a (PerCP), ficoeritrina cianina 7 (Pe-Cy7), aloficocianina cianina 7 (APC-Cy7), Pacific Blue (PB) o peridina de clorofila-a cianina 5 (PerCP-Cy5).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados.

Especificidad	Molécula conjugada	Clon	Isotipo / especie	Procedencia
Aislamiento de poblaciones celulares				
Monocitos				
CD24	-	M1/69	IgG2b / rata	(a)
CD43	-	S7	IgG2a / rata	(a)
CD45RA (B220)	-	RA3-6B2	IgG2b / rata	(a)
CD90.2 (Thy1.2)	-	AT15	IgG / rata	(a)
Ly6G	-	1A8	IgG2a / rata	BioXCell
MHCII	-	FD11	IgG2b / rata	(a)
Células T				
CD11b	Biotina	M1/70	IgG2b / rata	(a)
CD45RA (B220)	Biotina	RA3-6B2	IgG2b / rata	(a)
CD49b	Biotina	Dx5	IgG2b / rata	BD Biosciences
CD8 α	Biotina	53-6.72	IgG2a / rata	(a)
F4/80	Biotina	31-A3-1	IgG2b / rata	(a)
Ly6G	Biotina	1A8	IgG2a / rata	BioXCell
MHCII	Biotina	FD11	IgG2b / rata	(a)
Citometría de flujo				
CCR2	FITC	475301	IgG2b / rata	R&D
CD103	biotina	M290	IgG2a / rata	BD
CD11b	PeCy7	M1/70	IgG2b / rata	Biolegend
CD11c	APC/APC-Cy7	HL3	IgG / hamster	eBioscience/BD
CD16/32 (Fc γ RII/III)	-	2.4G2	IgG2b / rata	(a)
CD19	PE	ID3	IgG2a / rata	BD
CD24	biotina	M1/69	IgG2b / rata	(a)
CD4	APC	GK1.5	IgG2b / rata	eBioscience
CD45	PB	30-F11	IgG2b / rata	Biolegend
CD49b	biotina/PE	DX5	IgM / rata	BD/Biolegend
CD64	APC/PerCP-Cy5	X54-5/7.1	IgG1 / ratón	Biolegend/Biolegend
CD8 α	PeCy7	53-6.72	IgG2a / rata	Biolegend
CD90.2 (Thy1.2)	biotina/PE	AT15	IgG / rata	(a)/BD
F4/80	biotina	31-A3-1	IgG2b / rata	(a)
Ki-67	Alexa 647	16A8	IgG2a / rata	Biolegend
Ly6C	biotina/FITC	AL-21	IgM / rata	(a)
Ly6G	FITC/PE	1A8	IgG2a / rata	(a)/BD
MHC-II	biotina/FITC/APC	FD11	IgG2b / rata	(a)/BD/BD
Siglec-F	PE	E50-2440	IgG2a / rata	BD

(a) procedentes de hibridomas cultivados en el laboratorio.

3.- Metodología

3.1 Preparación de suspensiones celulares

3.1.1 Suspensiones celulares de médula ósea

La obtención de células de médula ósea se realizó a partir del fémur y la tibia,

mediante la inyección a través del canal medular de PBS (*phosphate-buffered saline*) suplementado con 5 mM EDTA (Panreac, Barcelona, España) y un 3% de FBS (PBS/EDTA/FBS). De la suspensión celular obtenida se eliminaron los eritrocitos mediante lisis por tratamiento durante 30 segundos a temperatura ambiente con un tampón de lisis compuesto por: 8,3g NH_4Cl , 1g NaHCO_3 , 40mg EDTA/ 1L dH_2O ; posteriormente se filtró a través de un filtro de 40 μm .

3.1.2 *Suspensiones celulares de bazo y ganglios*

Para la preparación de suspensiones celulares a partir del bazo, los órganos se disgregaron mecánicamente con la ayuda de dos portaobjetos y las células se resuspendieron en PBS/EDTA/FBS. A continuación se trató dicha suspensión con tampón de lisis eritrocitaria .

3.1.3 *Suspensiones celulares de pulmón*

La preparación de suspensiones celulares de pulmón se llevó a cabo cortando los órganos en pequeños trozos para su posterior digestión con 180 $\mu\text{g/ml}$ de liberasa TM (Roche, Mannheim, Alemania) y 40 $\mu\text{g/ml}$ Dnasa I (Roche) en medio RPMI durante 30 minutos a 37°C. Los fragmentos digeridos se pasaron a través de un filtro de 40 μm (BD Biosciences, San Diego, CA) y se resuspendieron en medio RPMI al 5% FBS. A continuación, se trató la suspensión con un tampón de lisis eritrocitaria.

3.1.4 *Suspensiones celulares del lavado bronqueoalveolar (BAL)*

La obtención de las células presentes en el espacio bronqueoalveolar se llevó a cabo mediante la canulación de la tráquea y posterior inyección y recuperación de 1 ml de PBS/EDTA/FBS. Se realizaron 3 lavados por ratón y las células fueron posteriormente tratadas con tampón de lisis eritrocitaria.

3.1.5 *Suspensiones celulares del lavado torácico*

Para la obtención de las células presentes en la cavidad torácica se inyectaron 5 ml de PBS, posteriormente se recuperó el volumen a través del diafragma y las células fueron tratadas con tampón de lisis eritrocitaria.

3.2 **Aislamiento de poblaciones celulares**

3.2.1 *Aislamiento de monocitos*

Los monocitos fueron aislados mediante selección negativa a partir de suspensiones celulares de médula ósea tratadas con tampón de lisis eritrocitaria. Para este fin, se eliminaron las células T, células B, DC, granulocitos y células NK después de la incubación con mAbs anti-CD90.2, B220, MHC-II, Ly-6G, CD43 y CD24, utilizando esferas magnéticas conjugadas con anti-IgG de rata (Dyna-Invitrogen), a una relación esfera:célula de 7:1.

Tras la depleción inmunomagnética, el porcentaje de monocitos fue superior al 85%.

3.2.2 *Aislamiento de células T CD4⁺*

Las células T OT-II CD4⁺ se purificaron mediante inmunoseparación magnética a partir de suspensiones de bazo. Se incubaron las células con mAb anti-B220, CD11b, CD8 α , Ly-6C, F4/80, MHC-II y CD49b conjugados con biotina y microesferas conjugadas con estreptavidina (estreptavidina-MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La pureza obtenida tras la depleción magnética fue superior al 95%.

3.3 Cultivos celulares

3.3.1 *Diferenciación y activación de moDCs*

Los monocitos purificados a partir de la médula ósea fueron cultivados durante 24 horas, a una concentración celular de 0.2×10^6 células/ml en presencia de 20ng/ml de GM-CSF, (Peprotech, London, RU) , con o sin 20ng/ml de interleuquina 4 (IL-4) (Peprotech). Las moDCs fueron posteriormente activadas en presencia de 30 μ g/ml de HDM (Greer; Lenoir, NC, USA), 100 μ g/ml de la proteína de OVA o 0,5 μ g/ml de LPS (Lipopolisacárido de *Escherichia coli*, Sigma). En algunos casos se determinó la producción de citoquinas (IL-12p70, IL-1 β , IL-6 y TNF- α) mediante ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA).

3.3.2 *Diferenciación y activación de BMDCs a partir de células de médula ósea*

Se cultivaron las células obtenidas tras la lisis de eritrocitos de la suspensión de médula ósea total en placas p150 a una concentración celular de 0.5×10^6 células/ml en presencia de 20ng/ml de GM-CSF (Peprotech). Se realizaron cambios de medio a día 3 de cultivo, desechando las células adherentes para eliminar los macrófagos, y a día 6 y a día 9, recuperando la totalidad de las células. A día 9 el enriquecimiento del cultivo en DCs era mayor de un 80%. Las BMDCs se purificaron por selección positiva utilizando métodos inmunomagnéticos, mediante la incubación secuencial con mAb anti-CD11c conjugado con biotina estreptavidina-MACS. La pureza obtenida tras la selección magnética fue superior al 95%. Las DCs obtenidas se activaron durante 2 y 5 horas en presencia de 0,5 μ g/ml de LPS o 30 μ g/ml de HDM.

3.3.3 *Cultivo de ganglios mediastinales*

Se cultivaron las suspensiones celulares de los ganglios mediastinales en placas de 24 pocillos a una concentración celular de 1×10^6 células/ml, en presencia o ausencia de 15 μ g HDM durante 4 días, con el fin de analizar el fenotipo y la producción de citoquinas IL-4, IL-5 e IFN- γ por ELISA.

3.4 Tinción GIEMSA

Se realizaron preparaciones celulares citocentrifugadas de 10^5 células obtenidas del BAL en PBS 20% FBS. Se utilizó una centrífuga Shandon Cytospin 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se centrifugó a 600 rpm durante 10 min.

Una vez secas, las preparaciones se fijaron durante 5 minutos con metanol filtrado, a continuación se incubaron con la solución de Giemsa (Sigma) durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y se incubaron con la solución de Giemsa diluída 1:15 durante una hora. Por último, se lavaron de nuevo con agua destilada y se dejaron secar antes de su montaje con DPX (Sigma).

3.5 Marcaje con CFSE

El marcaje de monocitos y células T con el trazador fluorescente CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*; Invitrogen) se realizó mediante la incubación de las células con RPMI 1% FBS y 5 μ M CFSE a una concentración de 5×10^6 células/ml durante 20 min a 37°C. Se paró la reacción con FBS, y finalmente las células se inyectaron en PBS.

3.6 Microarrays

El mRNA se aisló mediante el kit RNeasy Mini (Qiagen). Posteriormente, se amplificó con el kit de amplificación MessageAmp II aRNA (Ambion, Life Technologies, Paisley, United Kingdom). Las muestras control y las estimuladas se marcaron diferencialmente con Cy3 o Hy5 por medio del sistema SuperScript para marcaje de cDNA (Invitrogen, Life Technologies) y se hibridaron a 65°C durante 17h a un microarray de genoma completo de ratón (Mouse Whole Genome Microarray 4x44K; Agilent Technologies), según las instrucciones del fabricante.

Para visualizar y analizar los resultados se utilizó el programa FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>). El proceso de hibridaciones así como el análisis estadístico de los datos se desarrolló en la unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).

3.7 Ensayos *in vivo*

3.7.1 Ensayo de presentación *in vivo* de células T específicas para OVA

Para el ensayo de activación de células T *in vivo* se aislaron células T OT-II CD4⁺ del bazo, se marcaron con el trazador fluorescente CFSE para analizar su proliferación y se inyectaron 5×10^6 células T OT-II intravenosamente (i.v.) en ratones C57BL/6, en un volumen de 200 μ l de PBS. Pasadas 24h, se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) $0,5 \times 10^6$ moDCs en 200 μ l de PBS que habían sido incubadas previamente con 100 μ g/ml de la

proteína de OVA endograde (Hyglos, Bernried, Alemania) durante 4 horas. A los 3 días se extrajeron los ganglios mediastinales drenantes, y se analizó su activación, en términos de expresión de CD25, y la proliferación de las células T OT-II por citometría de flujo.

3.7.2 Inducción de alergia frente a HDM

El extracto del ácaro del polvo (HDM), utilizado tanto para la estimulación *in vivo* de los animales como para la activación *in vitro* de las DCs, procede de cultivos específicos del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* y fue adquirido en Greer (Lenoir, NC, USA).

Para la inducción de la reacción alérgica, los animales fueron inoculados intratraquealmente (i.t.). Para ello, fueron anestesiados con isoflurano al 3%, se les sujetó por los incisivos y se les inmovilizó la lengua con ayuda de unas pinzas. Manteniendo la boca abierta y la lengua inmovilizada se inocularon 20 μ g de HDM en un volumen de 60 μ l. Dichas inyecciones se realizaron a día 0, y a días 7, 8, 9, 10 y 11 en ratones C57BL/6, CCR2 KO e IFNAR KO, tal y como se indica en la [Figura 1](#).

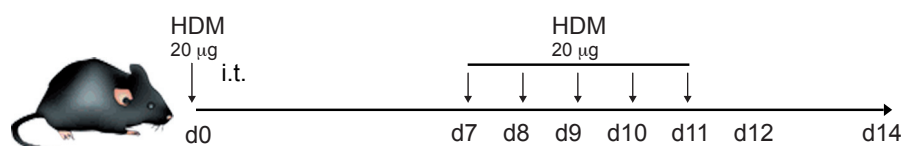


Figura 1. Protocolo para la inducción de una respuesta alérgica frente a HDM

También se ha utilizado una variación de este protocolo que consistía en una inyección i.p. a día 0 de 5×10^4 moDCs, previamente estimuladas con 30 μ g de HDM/ml durante 4h, seguida de 2 inoculaciones i.t. a día 7 y día 11 de 5 μ g de HDM tal y como se describe en la [Figura 2](#).

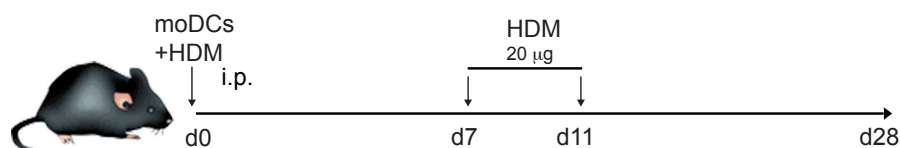


Figura 2. Protocolo para la inducción de una respuesta alérgica fuerte frente a HDM

3.7.3 Inducción de una respuesta Th1 en el pulmón

Se inyectaron i.p. 5×10^4 moDCs que habían sido previamente estimuladas con 100 μ g de OVA (Grado III; Sigma) y 0,5 μ g de LPS durante 4h, se inocularon los ratones i.t. con OVA o PBS a día 10 y se analizaron los mLNs a día 10, tal y como se describe en la [Figura 3](#).



Figura 3. Protocolo para la inducción de una respuesta Th1 en el pulmón

3.7.4 Infección *in vivo* con *Klebsiella pneumoniae*

La cepa de *Klebsiella pneumoniae* 43816 fue proporcionada por el Dr. Bengoechea de Queen's University, (Belfast, RU). Se creció en medio LB a 37°C con agitación durante 16h y se determinó la concentración del cultivo midiendo la absorbancia a 600nm. Típicamente, después de 16 horas el cultivo alcanzaba la fase estacionaria con una $OD_{600} \approx 1$, que corresponde aproximadamente a 10^9 bacterias/ml. Las bacterias se centrifugaron a 12000 rpm durante 12 minutos a 4°C, se resuspendieron en PBS y se inyectaron 500 CFUs por vía intratraqueal en un volumen de 50 μ l de PBS.

3.8 Citometría de flujo

3.8.1 Marcajes de superficie

Todos los marcajes se realizaron incubando con los mAbs diluidos en PBS/EDTA/FBS, en un volumen de 30 μ l por cada 10^6 células. En primer lugar, se bloquearon los receptores de la fracción constante de las IgGs (FcR) con mAb purificados anti-Fc γ RII/III (CD16/32). A continuación, se incubó con los mAbs biotinilados durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, se incubaron las células con los anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos (FITC, PE, PeCy7, APC, APC-Cy7 y Pacific Blue) junto con la estreptavidina conjugada con PerCP, que se une a los anticuerpos biotinilados; esta incubación se realizó en el mismo tampón durante 15 minutos a 4°C y en oscuridad. Las distintas combinaciones de anticuerpos se detallan en la [Tabla 3](#).

Se ha utilizado un citómetro LSR II (BD) y los datos se han analizado utilizando el software CellQuest Pro (BD) o el software FlowJo (Tree Star).

3.8.2 Marcaje intracelular de Ki-67

En primer lugar se realizó un marcaje de superficie frente a Siglec-F-PE, CD11b-Pecy7, CD64-PerCP-Cy5, CD45-PB y CD11c-APC-Cy7. A continuación, se fijaron las células en 100 μ l de buffer BD Citofix/Citoperm (BD Biosciences) 10 min a temperatura ambiente, se centrifugaron las células y se añadieron 50 μ l de Ki-67 Alexa 647 diluido en buffer BD Perm/Wash (BD Biosciences) por cada 10^6 células y se incubaron 16h a 4°C.

3.8.3 Marcaje de Anexina/7AAD

En primer lugar se realizó un marcaje de superficie frente a Siglec-F-PE, CD11b-Pecy7, CD64-APC, CD45-PB y CD11c-APC-Cy7. Una vez finalizado el marcaje extracelular se lavó 2 veces con PBS y se añadieron 200 μ l de binding buffer (BD Biosciences) por cada 10^6 células. De esos 200 μ l, 100 μ l serán nuestro control y a los otros 100 μ l se le añadieron 10 μ l de Anexina FITC (BD Biosciences) y 20 μ l de 7AAD. Se incubó durante 15 min a 4°C, se añadieron otros 100 μ l de binding buffer a cada tubo y se pasó inmediatamente por el citómetro.

Tabla 3. Combinaciones de anticuerpos utilizados en citometría de flujo para suspensiones de pulmón y de BAL.

Suspensiones de pulmón		
Identificación de poblaciones de mo/Mφ/DCs		
Capa #1	Capa #2	Capa #3
CD16/32	Ly-6C-biot o CD103-biot	MHCII-FITC Exclusión-PE CD11b-PeCy7 CD64-APC CD11c-APCy7 CD45-PB Avidina-PercP
Identificación de Nφ, NKs, Eos y AMφ		
Capa #1	Capa #2	Capa #3
CD16/32	CD49b-biot	Ly-6G-FITC SiglecF-PE CD11b-PeCy7 CD64-APC CD11c-APCy7 CD45-PB Avidina-PercP
Suspensiones de BAL		
Identificación de TCs, Nφ, Eos y AMφ		
Capa #1	Capa #2	Capa #3
CD16/32	CD90-biot	Ly-6G-FITC SiglecF-PE CD11b-PeCy7 CD64-APC CD11c-APCy7 CD45-PB Avidina-PercP

RESULTADOS

Papel de IL-4 en el acondicionamiento de las moDCs para la inducción de respuestas Th2

Las funciones de IL-4 resultan cruciales durante el proceso alérgico, no sólo en la polarización de células T CD4⁺, sino que también juega un papel fundamental en la regulación del cambio de isotipo a IgE en las células B, en la permeabilidad de las células epiteliales y en la contractibilidad muscular (Anthony et al., 2007). Sin embargo, el efecto de IL-4 sobre las DCs no estaba claro hasta el momento. En este sentido, en nuestro laboratorio se ha estudiado el papel de IL-4 durante la diferenciación de los monocitos a células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs). Los datos sugieren que IL-4 inhibe la expresión de citoquinas polarizantes Th1 y otros mediadores inflamatorios tras su estimulación con LPS mediante la deacetilación de sus promotores, lo cual produce su represión transcripcional (Lopez-Bravo et al., 2013). Como continuación a este estudio, en una primera fase del desarrollo de esta tesis doctoral, se ha llevado a cabo la validación *in vivo* de estos datos en un modelo de alergia frente a HDM.

El protocolo para la obtención de las moDCs control (C-moDCs) y las moDCs condicionadas por IL-4 (IL4-moDCs) se describe en detalle en (Lopez-Bravo et al., 2013). En resumen, se aislaron monocitos de médula ósea y se cultivaron en presencia de GM-CSF, suplementado o no con IL-4, durante 24 horas para generar moDCs inmaduras, éstas fueron posteriormente activadas mediante su estimulación con LPS durante las 16 horas siguientes (Figura 1, A). Observamos que la expresión de CD11c y MHCII, marcadores característicos de las DC, era similar en ambos tipos de moDCs y que las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 incrementaban su expresión correctamente tras la estimulación con LPS (Figura 1, B). Al analizar la capacidad de producción de citoquinas, observamos que la IL-12, citoquina polarizante a Th1 y otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α estaban disminuidas en las IL4-moDCs en comparación con las C-moDCs (Figura 1, C).

Para el protocolo de inducción de alergia *in vivo*, tanto las C-moDCs como las IL4-moDCs se estimularon *in vitro* con HDM y se inyectaron i.p. en ratones C57BL/6, que posteriormente se inocularon intranasalmente (i.n) con HDM los días 7 y 11, tal y como se describe en la Figura 2, A. A día 14 se analizó el BAL y los M-LNs (ganglios mediastinales). Aunque generalmente la inyección i.p. se utiliza para conseguir una inmunización sistémica, está descrito que la cavidad peritoneal posee un drenaje linfático consistente en tres vías, la primera consiste en el transporte a través del mesotelio de cada uno de los órganos existentes en la cavidad peritoneal, la segunda drena los ganglios paratímicos a través de estomas que cruzan el diafragma y la tercera, conduce al ganglio mediastinal (M-LN) caudal a través de los conductos linfáticos diafragmáticos (Abernethy et al., 1991; Tilney, 1971). Se ha demostrado que inyectando las DCs i.p. la respuesta tiene lugar de manera específica en los M-LNs (Kool et al., 2008).

El análisis del BAL a día 14, tanto en los ratones inyectados con C-moDCs como en los inyectados con IL-4 moDCs, mostró una fuerte infiltración de eosinófilos; esta infiltración era un 20% mayor en el caso de los ratones inyectados con IL4-moDCs (Figura 2, B). Del mismo modo, el reclutamiento de eosinófilos a los M-LNs de los ratones inyectados con

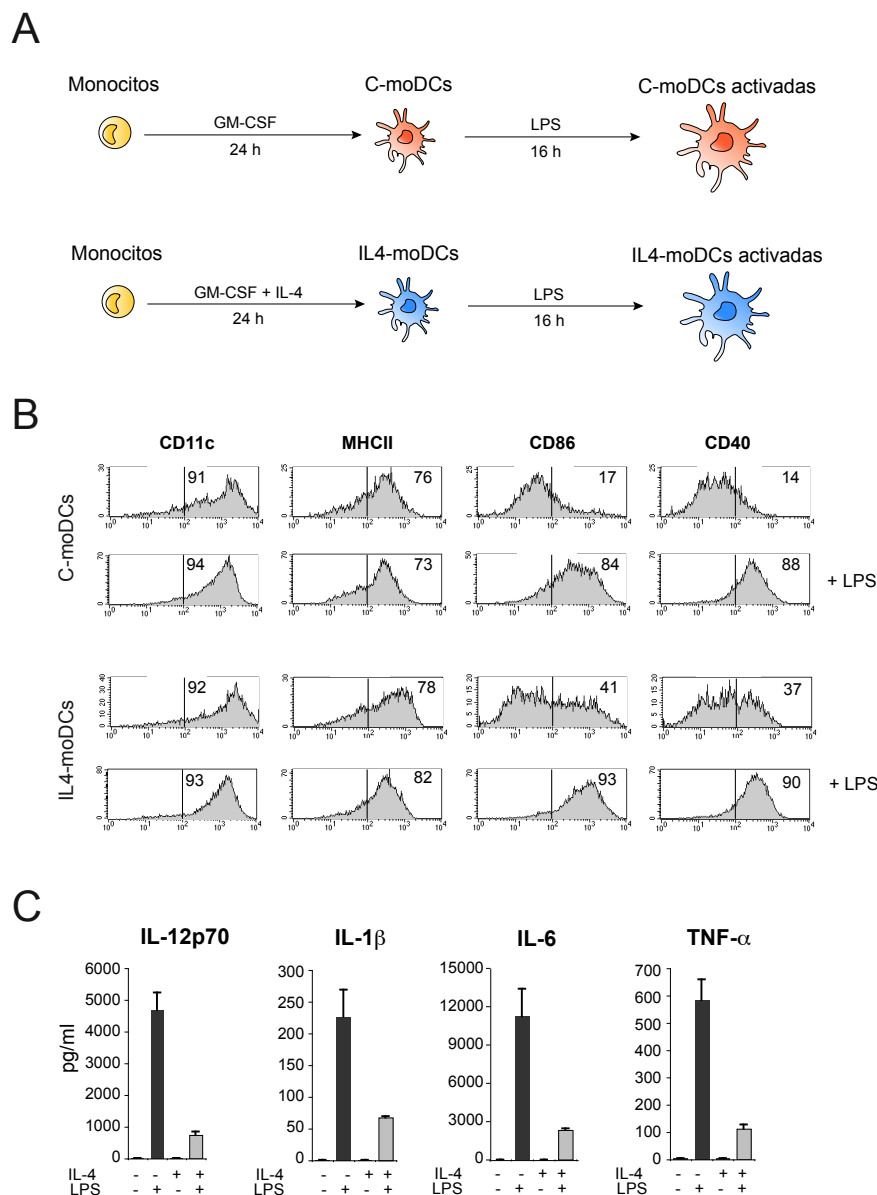


Figura 1. Fenotipo y producción de citoquinas por C-moDCs e IL4-moDCs. **A.** Esquema empleado para el acondicionamiento de las moDCs. Se aislaron los monocitos por selección negativa a partir de una suspensión de médula ósea total y se pusieron en cultivo en presencia de GM-CSF o GM-CSF+IL4 durante 24h, cuando se indica, las moDCs fueron estimuladas con LPS, durante 16h. **B.** Caracterización fenotípica de las C-moDCs e IL4-moDCs por citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de células positivas para CD11c, MHCII, CD86 o CD40 en relación a su control de isotipo, indicado como una línea vertical. **C.** Análisis mediante ELISA de la producción de las citoquinas indicadas por C-moDCs e IL4-moDCs 16h después de la estimulación con LPS.

IL4-moDCs era muy superior al de los ratones inyectados con C-moDCs (Figura 2, C). El análisis de la reacción alérgica se llevó a cabo mediante la estimulación de los M-LNs *in vitro* durante 96h en ausencia o presencia de HDM. Las IL4-moDCs produjeron mayor cantidad de IL-4 e IL-5 que las C-moDCs, y en ambas condiciones se observaron niveles bajos de IFN- γ (Figura 2, D). Estos datos demuestran que IL-4 mejora el potencial de las moDCs para la inducción de respuestas Th2 durante un proceso alérgico frente a HDM.

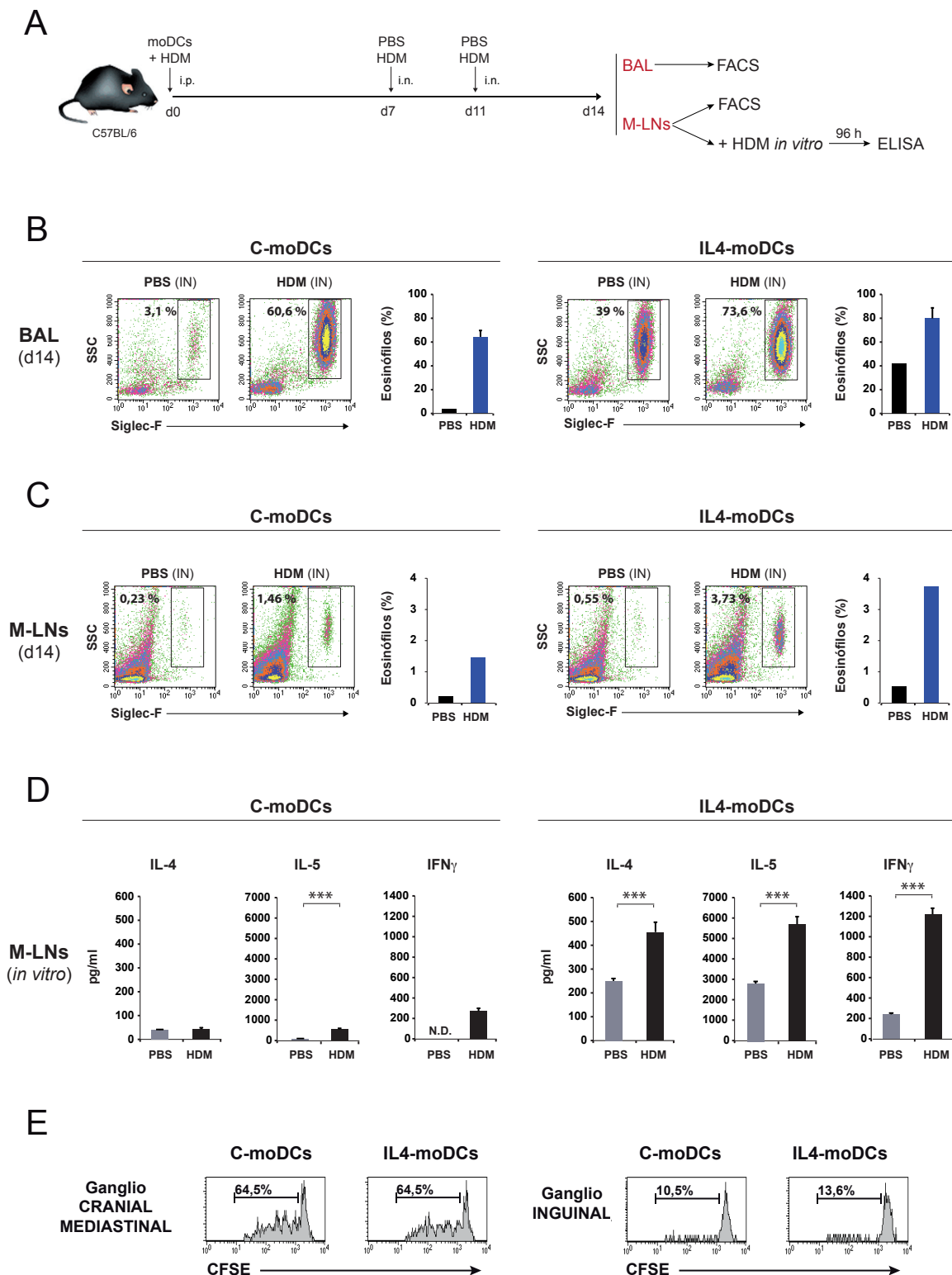


Figura 2. IL-4 licencia las moDCs para la inducción de respuestas Th2 frente a HDM *in vivo*. **A.** Protocolo para la inducción de respuestas alérgicas frente a HDM mediante la inyección i.p. de moDCs estimuladas con 30 μ g/ml de HDM y posteriores inoculaciones i.n. de HDM o PBS a día 7 y día 11. A día 14 se analizó el BAL y los M-LNs por citometría de flujo y se estimularon los M-LNs *in vitro* con HDM durante 96h para evaluar la producción de citoquinas mediante ELISA. **B.** Análisis y cuantificación por citometría de flujo de los eosinófilos presentes en el BAL a día 14 después de la transferencia de C-moDCs o IL4-moDCs. Se han definido

en base a su SSC y expresión de Siglec-F. **C.** Análisis y cuantificación por citometría de flujo de los eosinófilos presentes en los M-LNs a día 14 después de la transferencia de C-moDCs o IL4-moDCs. **D.** Análisis por ELISA de la producción de las citoquinas indicadas por los M-LNs a día 14 tras 96 horas en cultivo, en presencia o ausencia de 15 µg/ml de HDM, de los ratones inyectados con C-moDCs o IL4-moDCs. **E.** Para evaluar la respuesta T inducida por las C-moDCs e IL4-moDCs *in vivo* se inyectaron i.p. $0,5 \times 10^6$ C-moDCs o IL4-moDCs estimuladas con OVA en ratones C57BL/6 que habían recibido el día anterior 5×10^6 células T OT-II CD4⁺ i.v. marcadas con CFSE. La proliferación de las células T se cuantificó 3 días después de la inyección de las moDCs en los M-LNs y en los inguinales en términos de la dilución de CFSE. Se indica el porcentaje de las células OT-II en división.

Con el fin de confirmar que los niveles de producción de citoquinas se deben a una diferencia en la respuesta inducida por las C-moDCs e IL4-moDCs, y no a diferencias en migración o en la capacidad de estimulación de células T, se analizó la capacidad de las C-moDCs e IL4-moDCs para inducir proliferación de células T en los M-LNs. Para ello, se inyectaron i.v. ratones C57BL/6 con células T transgénicas cuyo TCR reconoce específicamente el péptido de OVA (células T CD4⁺ OT-II) marcadas con el trazador CFSE. Un día más tarde, se inyectaron i.p. C-moDCs e IL4-moDCs cargadas con la proteína de OVA y tres días después se analizaron los M-LNs y los ganglios inguinales (i-LNs) como control. Los resultados indicaron que la inyección i.p. de moDCs indujo una respuesta específica en las células T CD4⁺ OT-II de los M-LNs que no se observó en los i-LNs, y además, que ambos tipos de moDCs generaron una respuesta similar en cuanto a proliferación de células T CD4⁺ OT-II analizada en base a la dilución de CFSE (Figura 2, E).

Los datos de la Figura 2, D muestran que los M-LNs de los ratones inyectados con IL4-moDCs, aunque produjeron mayor cantidad de citoquinas Th2 que los de los ratones inyectados con C-moDCs, también liberaron más IFN-γ. Sin embargo, estos niveles se consideran bajos en comparación a los que se producen durante una respuesta Th1 en el pulmón inducida por moDCs estimuladas con LPS (Figura 3, C). Para generar una respuesta Th1 en el pulmón, se utilizó un protocolo que consistía en la inyección i.p. de moDCs cargadas con OVA y estimuladas con LPS y una única estimulación i.n. con el antígeno o con PBS (Figura 3, A). A los 10 días, el análisis del BAL mostró que existía una pequeña infiltración de eosinófilos (Figura 3, B), aunque mucho menor que en el caso de la respuesta Th2. El análisis de la reacción inflamatoria en los M-LNs, reveló que la cantidad de IFN-γ producida por los M-LNs (Figura 3, C) era 30 veces superior a la producida en el protocolo de alergia con IL4-moDCs (Figura 2, D), mientras que no existía producción de IL-4 y apenas de IL-5 (Figura 3, C).

Definición de las poblaciones leucocitarias pulmonares en reposo

Nuestro objetivo era caracterizar las poblaciones leucocitarias presentes tanto en el parénquima pulmonar, como en el BALT, por citometría de flujo. Basándonos en los protocolos utilizados en otros órganos como bazo o timo, en los primeros experimentos se utilizó Colagenasa A y DNasa I para aislar las células leucocitarias de las estructurales,

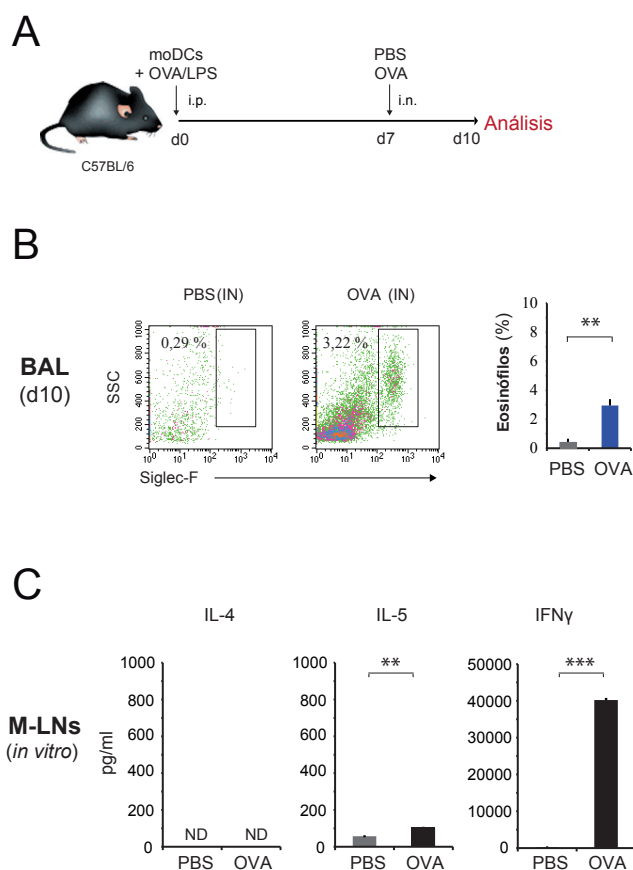


Figura 3. Polarización Th1 en el pulmón inducida por moDCs estimuladas con LPS.

A. Protocolo para la inducción de una respuesta Th1 frente a OVA en el pulmón. A día 0, se inyectaron i.p. moDCs estimuladas con LPS y cargadas con OVA, y a día 7, se inoculó i.n. OVA o PBS. El análisis se llevó a cabo a día 10. **B.** Análisis y cuantificación de la infiltración de eosinófilos en el BAL 10 días después de la transferencia de moDCs. **C.** Cuantificación por ELISA de la producción de citoquinas en los M-LNs a día 10 tras 96h en cultivo estimuladas con 100 μ g/ml de OVA o PBS.

pero la definición de las poblaciones por citometría de flujo no era suficientemente precisa. Para el análisis de las poblaciones leucocitarias de interés se excluyeron las células B, células T, células NK, neutrófilos, eosinófilos y AM ϕ s mediante anticuerpos contra CD19, CD90, CD49b, Siglec-F y Ly-6G, y se analizaron las células CD11b $^{+}$ en base a MHCII y CD64 (Figura 4, A). La población mayoritaria era la doble negativa, que representaba un 97% del total de las células CD11b $^{+}$. Sin embargo, apenas existían poblaciones definidas MHCII $^{+}$ /CD64 $^{-}$, MHCII $^{+}$ /CD64 $^{+}$ o MHCII $^{-}$ /CD64 $^{+}$. Para intentar incrementar el rendimiento y la definición de las poblaciones CD45 $^{+}$, se utilizó liberasa, un cóctel de enzimas comercial que incluía Colagenasa I, Colagenasa II y Termolisina. Después de este tratamiento, el análisis por citometría de flujo nos permitió identificar poblaciones distintas en base a su nivel de CD64 y MHCII (Figura 4, B). El tratamiento con liberasa nos permitía recuperar cuatro veces más células CD45 $^{+}$ que el tratamiento con colagenasa (Figura 4, C), lo que se tradujo en un incremento de dos veces en las poblaciones Excl $^{+}$ /CD11b $^{-}$ y Excl $^{+}$ /CD11b $^{+}$ y de hasta tres veces en la población Excl $^{+}$ /CD11b $^{+}$ (Figura 4, C). Por lo tanto, el cambio de protocolo incrementó el rendimiento del aislamiento, facilitó la caracterización de las diferentes poblaciones por FACs y se consiguió mayor reproducibilidad entre experimentos.

Sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar

Una vez concluimos que el protocolo de digestión enzimática más adecuado para el parénquima pulmonar era el que utilizaba el cóctel liberasa, se realizó un detallado análisis

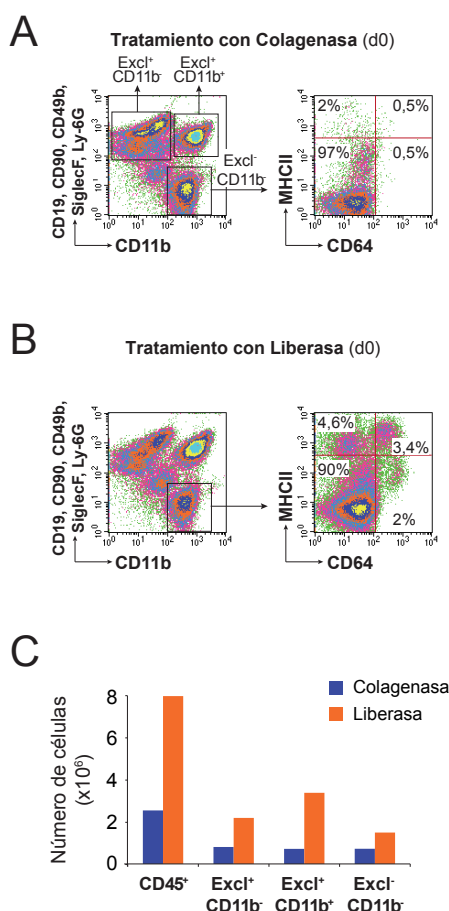


Figura 4. Métodos para el procesamiento de pulmón. **A.** Suspensión pulmonar obtenida tras un tratamiento con colagenasa 30 min a 37°C. Se analizaron las poblaciones en base a CD19, CD90, CD49b, SiglecF y Ly-6G (Excl⁺) y CD11b; se muestran también los niveles de MHCII y CD64 de la población Excl⁺ CD11b⁺. **B.** Suspensión pulmonar obtenida tras un tratamiento con liberasa 30 min a 37°C. Se analizaron las poblaciones mieloides principales en base a la expresión de CD11b, MHCII y CD64. **C.** Número absoluto de células CD45⁺, Excl⁺ CD11b⁻, Excl⁺ CD11b⁺ y Excl⁺ CD11b⁺ obtenidas tras el procesamiento con colagenasa o liberasa.

de los diferentes subtipos de DCs, monocitos y MØs presentes en el pulmón de ratones control C57BL/6. La suspensión celular obtenida tras la digestión enzimática se analizó mediante citometría de flujo de 6 colores. En primer lugar, se seleccionaron las células del sistema hematopoyético mediante la expresión de CD45. A continuación, se utilizó uno de los canales, en nuestro caso FL2, para excluir las células pulmonares leucocitarias mayoritarias y facilitar así el estudio de las poblaciones de interés. En este sentido, se emplearon anticuerpos anti-CD19, anti-CD90, anti-CD49b, anti-Siglec-F y anti-Ly-6G conjugados con ficoeritrina para excluir células B, células T, células NK, eosinófilos, AMØs y neutrófilos de nuestro análisis. Posteriormente, se enfrentó CD64 a MHCII, lo que nos permitió la definición de los subtipos principales de DCs, monocitos y MØs (Figura 5, A).

Las cDCs CD11b⁺ y CD103⁺ se definieron, dentro de las células MHCII^{high} CD64⁻, como células CD11b^{high} CD103⁻ y CD11b^{int} CD103⁺ respectivamente. Los monocitos Ly-6C^{high} y Ly-6C^{low}, en la región de células MHCII⁻ CD64^{low}, como células Ly-6C^{high} CD11c^{low} y Ly-6C^{low} CD11c^{int}, respectivamente. Por último, en la región de células CD64⁺ se definieron dos poblaciones principales de células en base a su expresión diferencial de MHCII y Ly-6C: células MHCII^{high} Ly-6C^{low} y células MHCII^{int} Ly-6C^{int} (Figura 5, A). Además, en esta última región de células CD64⁺, se detectó una población minoritaria que expresaba niveles entre intermedios y altos de MHCII y Ly-6C; éstas correspondían a moDCs inmaduras (i-moDCs), tal y como explicaremos a continuación.

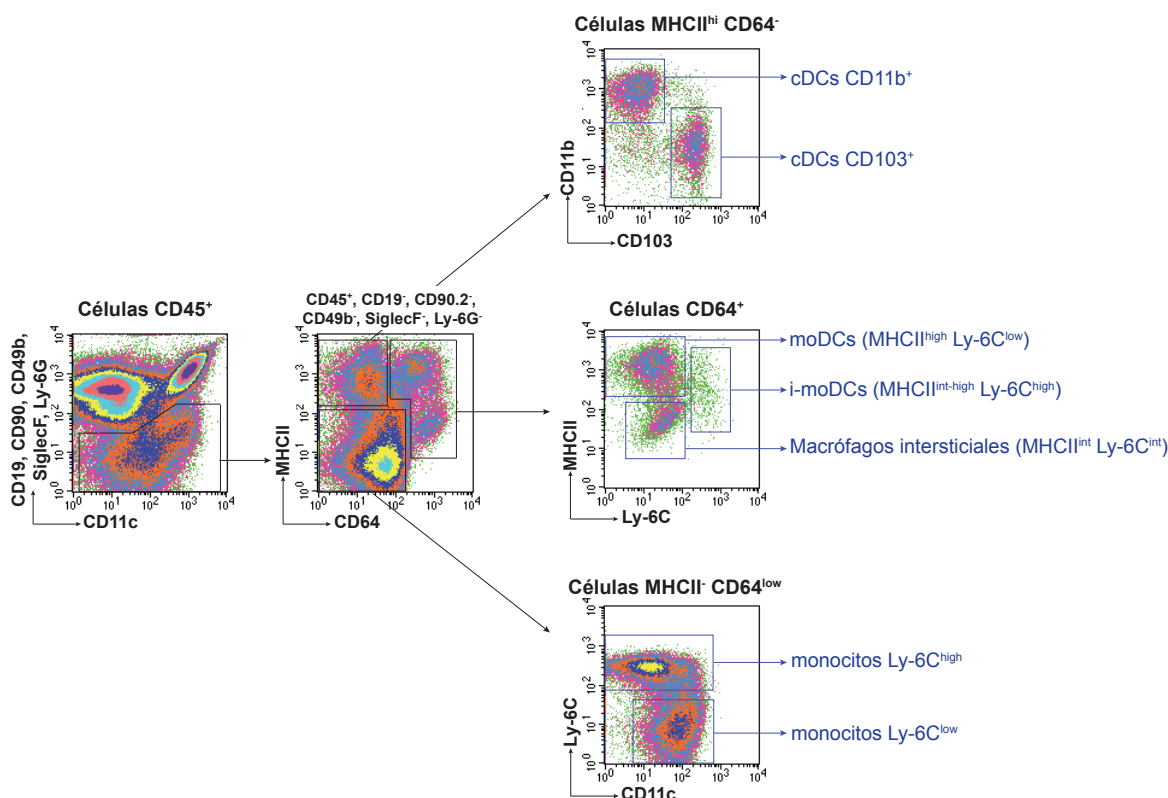


Figura 5. Caracterización de las poblaciones pulmonares en reposo. Definición de las células dendríticas, monocitos y macrófagos pulmonares en base a la expresión de los marcadores indicados. En primer lugar, se seleccionaron las células CD45⁺ y se excluyeron las células B, células T, células NK, eosinófilos, AMØs y neutrófilos, incluyendo en el mismo canal los marcadores indicados (CD19, CD90, CD49b, SiglecF y Ly-6G). Posteriormente, enfrentando MHCII a CD64 se obtuvieron tres regiones. Las cDCs eran MHCII⁺ CD64⁻ y se identificaron las cDCs CD11b⁺ y cDCs CD103⁺ en base a la expresión de esos marcadores. Dentro de las células CD64⁺ se localizaban las moDCs maduras e inmaduras (i-moDCs) y los macrófagos intersticiales. Los monocitos eran MHCII⁻ CD64⁻ e incluían monocitos Ly-6C^{hi} y Ly-6C^{low}.

Para evaluar si las poblaciones descritas anteriormente eran de origen monocítico, se analizaron ratones CCR2^{-/-}. Estos ratones son deficientes en el receptor de quimioquina CCR2, el cual controla la salida de los monocitos desde la médula ósea y por lo tanto, indirectamente, el reclutamiento de monocitos a los tejidos periféricos (Tsou et al., 2007). Se observó un descenso significativo en el número de monocitos Ly-6C^{high} pulmonares (Figura 6, A). La población CD64⁺ MHCII^{high} Ly-6C^{low} también estaba disminuida (Figura 6, A). Sin embargo, el defecto en CCR2 no afectó a las células CD64⁺ MHCII^{int} Ly-6C^{int} (Figura 6, A), sugiriendo que esta última población no derivaba de monocitos adultos. Por otro lado, tal y como se describe en la Figura 9, B, durante el proceso alérgico frente a HDM se produjo un incremento en el número absoluto de células CD64⁺ MHCII^{high} Ly-6C^{low} de día 7 a día 14, lo que no ocurría en los ratones CCR2^{-/-} (Figura 14, B). Por el contrario, el número de células CD64⁺ MHCII^{int} Ly-6C^{int} no varió significativamente de día 7 a día 14 tras la estimulación con HDM. Estos datos sugieren que las células CD64⁺ MHCII^{high} Ly-6C^{low}

correspondían a moDCs. Las moDCs fueron previamente descritas en el pulmón durante la alergia inducida por HDM (Plantinga et al., 2013), nuestros datos indican que también se podían encontrar en el pulmón en situación de reposo. Las células CD64⁺ MHCII^{int} Ly-6C^{int} por su parte, no estaban reducidas en los ratones CCR2^{-/-} (Figura 6, A). Esto significaba que su origen no era monocítico y que podían ser macrófagos intersticiales (iMØs).

Existe controversia en la descripción de las poblaciones de moDCs y iMØs entre diferentes grupos. En un estudio en el que analizan las poblaciones pulmonares en reposo, denominaron iMØs a una población CD11b⁺ CD11c⁺ CD64^{hi} MHCII⁺ CD24⁻ (Misharin et al., 2013). En otra aproximación, utilizaron la molécula MerTK para diferenciar las poblaciones de moDCs y iMØs, siendo las moDCs MerTK⁻ y los iMØs MerTK⁺ (Jakubzick et al., 2013). Por último, durante una reacción alérgica frente a LPS, los iMØs se han identificado como células F4/80⁺ CD11c⁻ (Bedoret et al., 2009). Estas diferencias pueden deberse a variaciones en la flora entre animalarios. En nuestras instalaciones, los ratones estabulados durante nuestros experimentos conviven temporalmente con otros animales de experimentación que potencialmente podrían ser causantes de alteraciones en su estado microbiológico. Para minimizar esta posibilidad y confirmar que tanto las moDCs como los iMØs estaban presentes en reposo, se analizaron dichas poblaciones en ratones libres de patógenos recibidos directamente de la casa comercial. En los pulmones de estos ratones se detectaron tanto células CD64⁺ MHCII^{high} Ly-6C^{low} como células CD64⁺ MHCII^{int} Ly-6C^{int} (Figura 6, B), lo que indicaba que ambas poblaciones existían en situaciones no inflamatorias.

Existen datos que proponen que los iMØs derivan de precursores embrionarios (Jakubzick et al., 2013), pero es una población que está poco caracterizada fenotípica y funcionalmente, confundiéndose en numerosas ocasiones con las moDCs. Para contribuir a su caracterización fenotípica, se analizaron diferentes marcadores en moDCs y iMØs en un pulmón en reposo. Los datos indicaban que ambas poblaciones expresaban niveles diferentes de MHCII y Ly-6C, siendo las moDCs MHCII^{high} Ly-6C^{low} y los iMØs MHCII^{int} Ly-6C^{int}, tal y como se ha descrito anteriormente. Además, existían diferencias en la expresión de CCR2; las moDCs expresaban niveles mayores de CCR2, lo que respaldaba la hipótesis sobre su origen monocítico (Figura 6, C). Con el fin de descartar que los iMØs pudieran ser MØs torácicos que quedaran adheridos al exterior del pulmón en el momento de la extracción del órgano, se realizó un lavado torácico previo a la extracción del pulmón. Las células que se obtuvieron del lavado torácico fueron células B y MØs torácicos. Los MØs torácicos expresaban altos niveles de CD11b. Se pueden diferenciar dos subpoblaciones en base a la expresión de MHCII y F4/80: MØs MHCII^{hi} F4/80^{low} y MØs MHCII^{low} F4/80^{hi} (Figura 6, D). Este fenotipo correspondía con el fenotipo descrito para los MØs peritoneales (Cassado Ados et al., 2015). Tras el lavado torácico, la población de iMØs (MHCII^{int} F4/80^{int}) seguía presente en el pulmón (Figura 6, D). Además, dentro de las células CD64⁺ pulmonares, no se detectaron células con el fenotipo de los MØs torácicos (Figura 6, D). Estos datos sugieren que la población de iMØs era una población pulmonar distinta de la de los MØs torácicos.

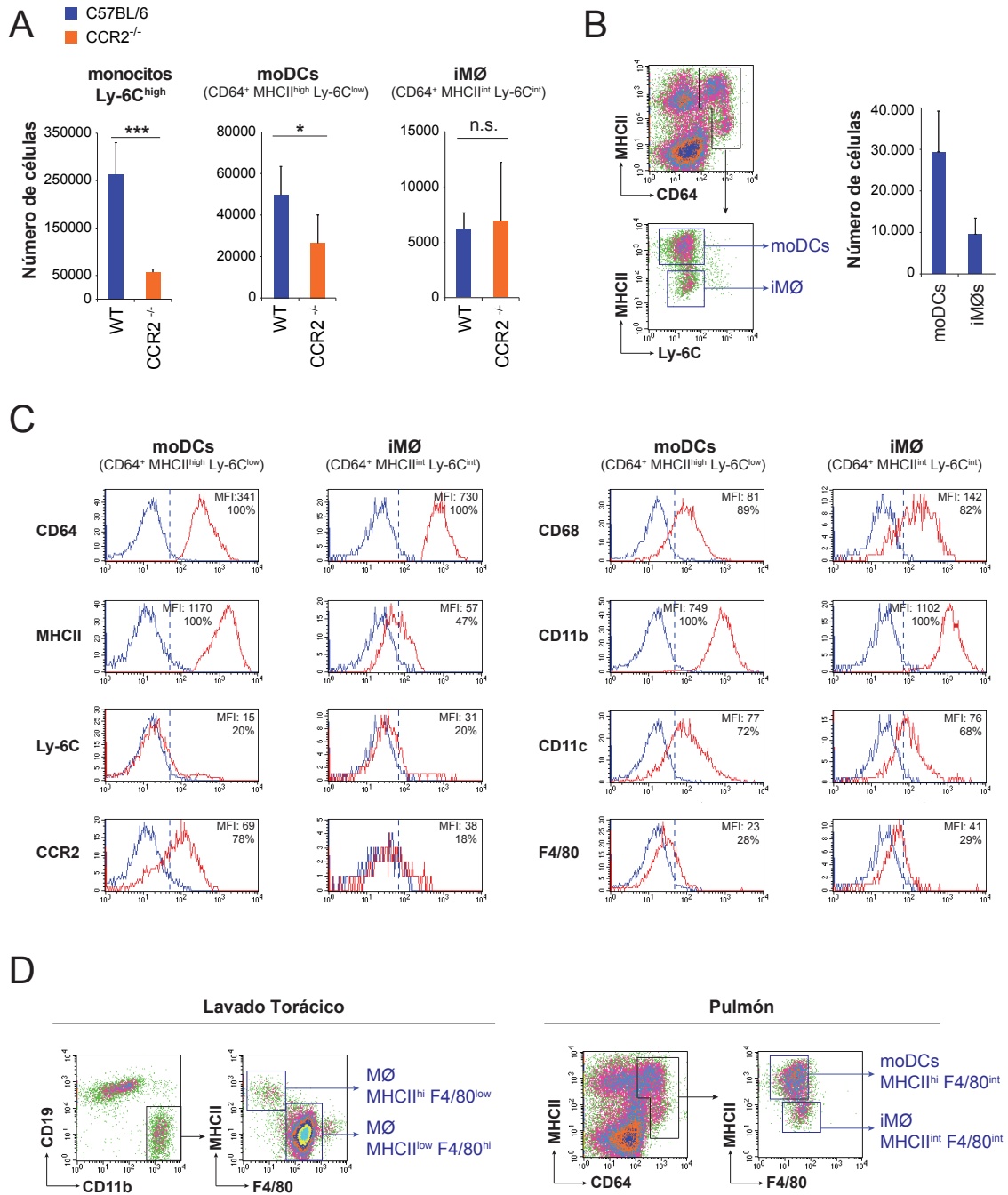


Figura 6. Descripción de las poblaciones de moDCs y iMØs en reposo. **A.** Cuantificación de los monocitos Ly-6C^{hi}, moDCs y iMØs en ratones WT y CCR2^{-/-} en base al fenotipo descrito en la Figura 5, A. **B.** Análisis de un ratón libre de patógenos. Previamente, se seleccionaron las células CD45⁺ y se excluyeron células T, células B, células NK, eosinófilos, AMØs y neutrófilos. Las células CD64⁺ se analizaron en base a MHCII y Ly-6C y se identificaron y cuantificaron las moDCs y los iMØs. **C.** Niveles de expresión de los marcadores indicados para moDCs y iMØs en un pulmón en reposo. Las líneas azules representan el control isotópico de marcaje correspondiente, las líneas rojas el nivel del marcador correspondiente y las líneas verticales punteadas el nivel a partir del cual consideramos un marcaje positivo. Se indica la intensidad media de fluorescencia para cada marcador y el porcentaje de células positivas. **D.** Comparación de las células que encontramos en el lavado torácico con los iMØs. En el lavado torácico las células CD11b⁺ corresponden a macrófagos torácicos. Existen dos subpoblaciones de macrófagos torácicos en base a su expresión diferencial de MHCII y F4/80. En el pulmón por su parte, las moDCs son MHCII^{hi} F4/80^{int} mientras que los iMØs son MHCII^{int} F4/80^{int}.

Otras poblaciones pulmonares

Por último, se analizaron otras poblaciones leucocitarias importantes presentes en el pulmón. Los AMØs se definieron en base a la Siglec-F y CD11c. Los eosinófilos también expresaban Siglec-F, pero eran negativos para CD11c. Los neutrófilos fueron caracterizados por la expresión de Ly-6G, las células NK en base a CD49b, y las células T y células B por CD90 y CD19 respectivamente (Figura 7, A). Los AMØs son la población mayoritaria en el BAL en un ratón en reposo, entorno a un 90-95%, aunque también se detectó un reducido número de células T (alrededor de un 5%) y algunos neutrófilos (1-2%) (Figura 7, B).

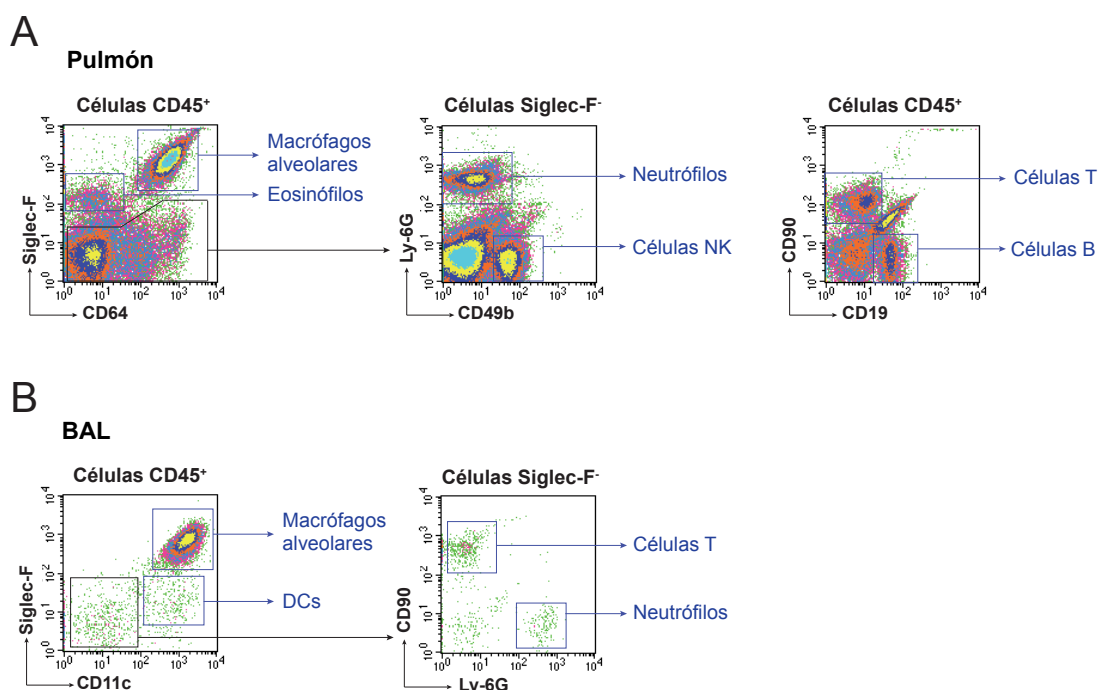


Figura 7. Caracterización de otras poblaciones en el pulmón y en el espacio alveolar de ratones en reposo. A. Caracterización de las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos, células NK, células T y células B en un pulmón en reposo. Dentro de las células CD45⁺ los AMØs eran SiglecF⁺ CD64⁺ y los eosinófilos SiglecF⁺ CD64⁻; excluyendo ambas poblaciones, los neutrófilos se caracterizaban por la expresión de Ly-6G⁺ y las células NK eran CD49b⁺. Las células T se identificaron en base a CD90 y las células B por CD19. **B.** Caracterización de las poblaciones alveolares de un ratón en reposo. Los AMØs eran SiglecF⁺ CD11c⁻, los neutrófilos eran Ly-6G⁺ y las células T eran CD90⁺.

Variaciones en las poblaciones pulmonares leucocitarias durante la respuesta alérgica frente a HDM

Análisis de la reacción alérgica frente a HDM

Con el objetivo de estudiar la cinética de las distintas poblaciones de DCs, monocitos y MØs durante la respuesta alérgica frente a HDM en ratones C57BL/6, se

llevaron a cabo experimentos de acuerdo con el protocolo descrito en la [Figura 8, A](#). A día 0, se inyectaron 20 μg de HDM i.t. y posteriormente se realizaron cinco inyecciones i.t. consecutivas los días 7, 8, 9, 10 y 11; los ratones se analizaron los días 7, 10, 12 y 14. La administración de HDM produjo una fuerte reacción alérgica caracterizada por el incremento en el número de eosinófilos tanto en el pulmón ([Figura 8, B](#)), como en el BAL ([Figura 8, C](#)), entre día 7 y día 12. Los AMØs aumentaron progresivamente en número de día 7 a día 12, disminuyendo a día 14 ([Figura 8, B](#)).

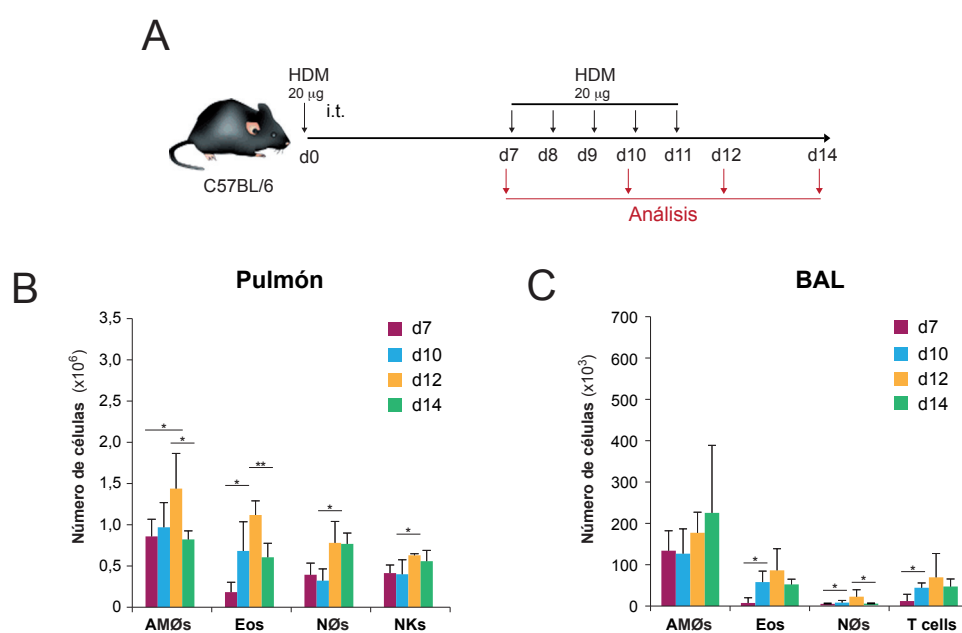


Figura 8. Protocolo de alergia frente a HDM en ratones C57BL/6. **A.** Modelo experimental que consiste en una primera inoculación de HDM i.t. a día 0 y 5 inoculaciones consecutivas los días 7, 8, 9, 10 y 11. El análisis fenotípico se llevará a cabo los días 7, 10, 12 y 14 del protocolo. **B.** A los tiempos indicados, se cuantificaron las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos y células NK en los pulmones de ratones expuestos a HDM. **C.** Cuantificación de las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos y células T en el BAL de ratones expuestos a HDM.

Variaciones en el sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar durante la respuesta alérgica frente a HDM

En el análisis de las poblaciones monocítico-DC-macrofágicas durante la respuesta alérgica frente a HDM se identificaron las cDCs CD11b⁺ y CD103⁺, en base a CD11b y CD24, respectivamente ([Figura 9, A](#)). Los monocitos Ly-6C^{hi} y Ly-6C^{low} se encontraban en la región doble negativa (MHCII⁻, CD64⁻) ([Figura 9, A](#)). En la región CD64⁺ las poblaciones a día 7 eran muy similares a las que encontrábamos a día 0, siendo las moDCs la población mayoritaria. Sin embargo, a medida que el proceso inflamatorio avanzaba, la población Ly-6C⁺, que anteriormente hemos denominado i-moDCs, era mayor ([Figura 9, A](#)).

Las cDCs CD11b⁺ y los iMØs no sufrieron variaciones importantes durante el proceso alérgico, mientras que el número de cDCs CD103⁺ disminuyó significativamente de día 7 a día 10 recuperando los niveles iniciales a día 14 ([Figura 9, B](#)). El número total

de moDCs (incluyendo i-moDCs) aumentó entre día 7 y día 10, y a continuación disminuyó hasta día 14. Este incremento iba parejo a una reducción en el número de monocitos Ly-6C^{high} (Figura 9, B), los cuales posteriormente aumentaron de día 12 a día 14. Por el contrario, la población de monocitos Ly-6C^{low} no experimentó variaciones significativas durante el proceso alérgico (Figura 9, B). Estos datos sugieren que los monocitos Ly-6C^{hi} se diferencian localmente a moDCs entre día 7 y día 10.

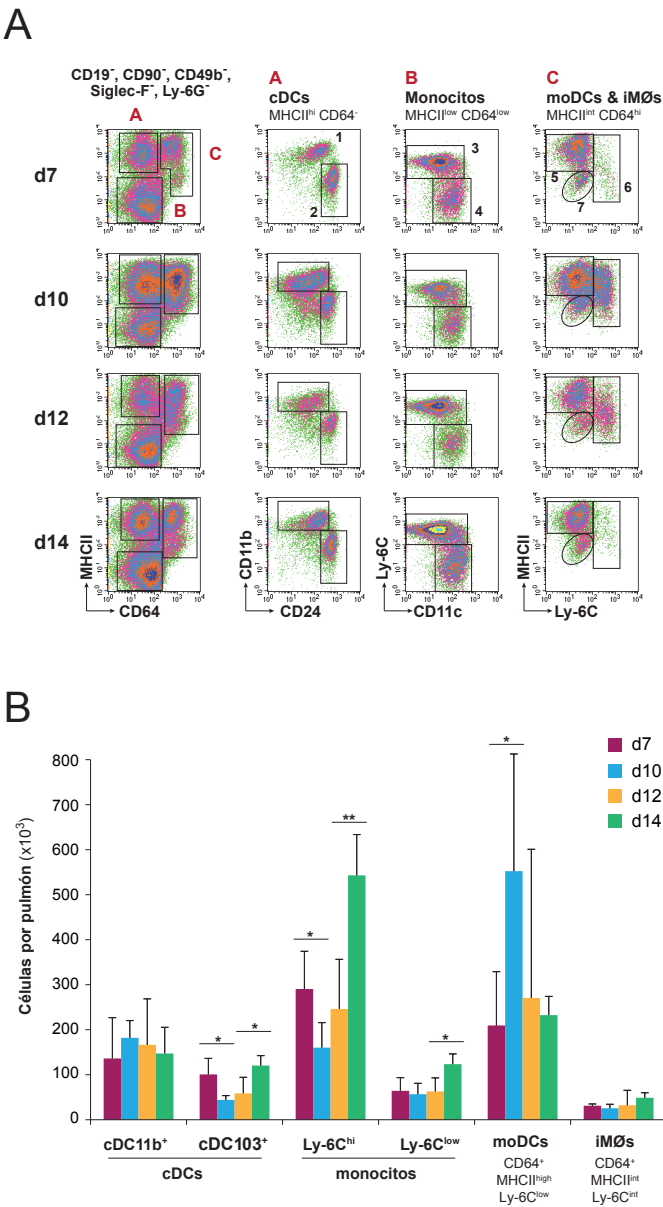


Figura 9. Caracterización de las poblaciones monocítico-DC-macrofágicas pulmonares durante un proceso alérgico frente a HDM en ratones C57BL/6. A. Estrategia de análisis para la caracterización de cDCs (MHCII^{hi} CD64⁻), monocitos (MHCII^{low} CD64^{low}) y moDCs/iMØs (MHCII^{int} CD64^{hi}) a día 7, 10, 12 y 14 durante el proceso alérgico. La región de cDCs incluía cDCs CD11b⁺ (1) y cDCs CD103⁺ (2). Los monocitos se subdividían en monocitos Ly-6C^{hi} (3) y Ly-6C^{low} (4). Las células MHCII^{int} CD64^{hi} incluían iMØs (7), i-moDCs (6) y moDCs (5). **B.** Cuantificación de cDCs, monocitos, moDCs y iMØs pulmonares en ratones C57BL/6 expuestos a HDM.

Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} durante la respuesta alérgica frente a HDM

Durante un proceso inflamatorio en la piel o en el intestino, se ha descrito que la transición de monocitos Ly-6C^{high} MHCII⁻ a moDCs Ly-6C^{low} MHCII^{high} ocurre a través un estadio inmaduro intermedio denominado P2 (Tamoutounour et al., 2013). P2 se caracteriza por el aumento en los niveles de expresión de MHCII y la pérdida de expresión de Ly-6C. Estudiamos, por lo tanto, la transición monocito-moDC en el pulmón durante el proceso alérgico frente a HDM analizando la expresión de MHCII y Ly-6C (Figura 10, A). A día 7, alrededor del 60% de las células eran monocitos Ly-6C^{high}, correspondientes a P1; P2 era casi inexistente; y el resto de las células correspondían a moDCs o P3 (Figura 10, B). Estos datos sugieren la existencia de una primera oleada de diferenciación de monocitos a moDCs tras la primera estimulación de HDM a día 0, de acuerdo con estudios previos (Plantinga et al., 2013). A día 10, coincidiendo con el pico en moDCs (Figura 9, B), tanto P2 como P3 aumentaron notablemente, reflejando una diferenciación activa de monocitos Ly-6C^{high} a moDCs. De día 10 a día 14 observamos un descenso en P2, a la par que un aumento en los monocitos Ly-6C^{high} (Figura 10, B), indicando que su diferenciación a moDCs cesaba tras la última inyección de HDM. A día 14, se produjo una acumulación de monocitos Ly-6C^{high} que podría reflejar su reclutamiento activo y el cese de su diferenciación.

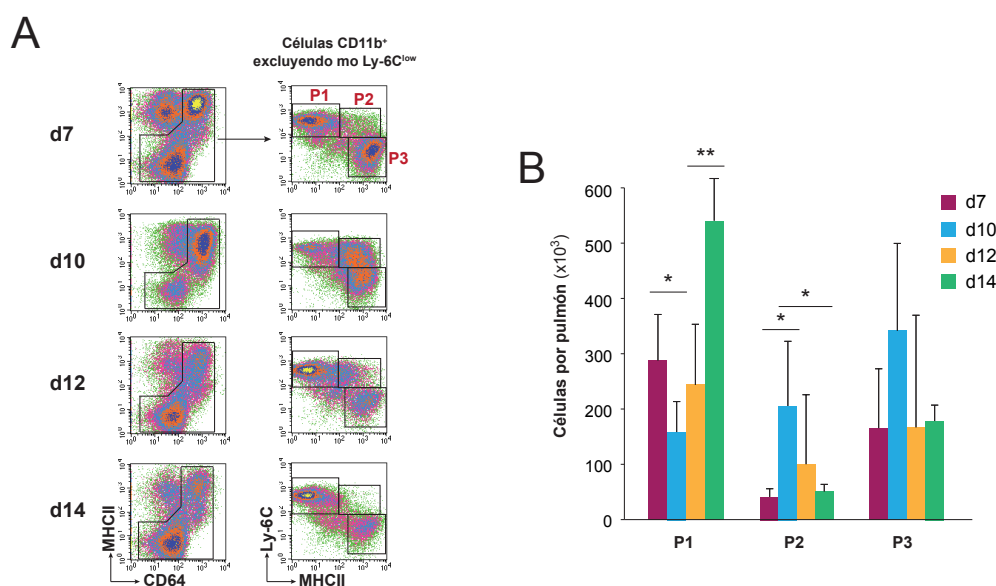


Figura 10. Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} durante la respuesta alérgica frente a HDM en ratones C57BL/6. A. La cascada de diferenciación monocítica se ha establecido excluyendo cDCs y monocitos Ly-6C^{low} del gráfico MHCII Vs CD64. Los monocitos (P1) son Ly-6C^{hi} MHCII⁻, durante el proceso alérgico ganan MHCII (P2) y pierden Ly-6C para terminar dando una población completamente diferenciada de moDCs (P3) con fenotipo Ly-6C^{low} MHCII^{high}. **B.** Cuantificación de P1, P2 y P3 durante la diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} inducida por HDM.

Caracterización de las moDCs por CCR2 y MerTK

Tal y como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta memoria, la distinción fenotípica entre las moDCs y las cDCs CD11b⁺ ha sido objeto de controversia. En este sentido, estudios recientes han utilizado la expresión de las moléculas CCR2 y MerTK (*MER Proto-Oncogene Tyrosine Kinase*) para identificar las moDCs (Jakubzick et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013). Sin embargo, tal y como se muestra en la [Figura 11](#), nuestros datos revelan que en el pulmón, aunque el análisis de la expresión de CCR2 y MerTK pueda ser indicativo para la identificación de cDCs CD11b⁺ y moDCs, el marcaje para CD64 es más específico.

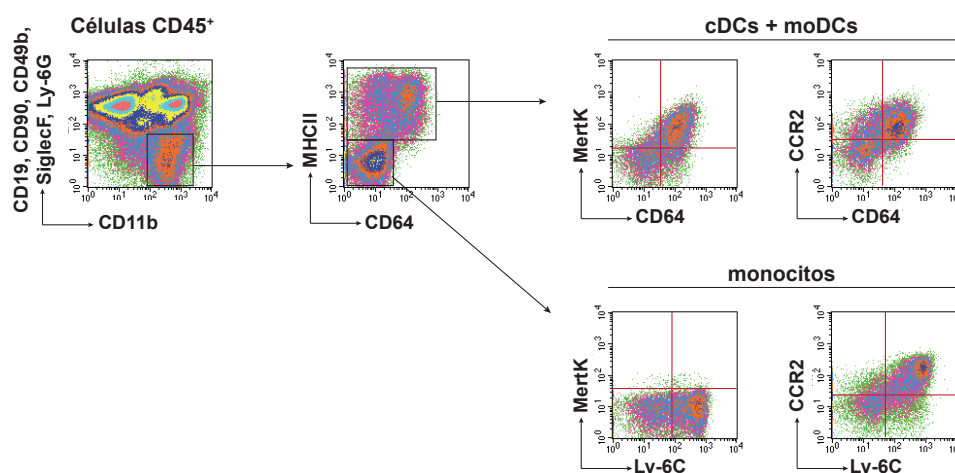


Figura 11. Expresión de MerTK y CCR2 por los monocitos y las DCs pulmonares. Después de seleccionar las células CD45⁺, se excluyeron las células CD19⁺, CD90⁺, CD49b⁺, Siglec-F⁺, Ly-6G⁺ y se seleccionaron las células CD11b⁺. Se analizaron las células MHCII⁺ (cDCs + moDCs) en base a MerTK–CD64 y CCR2–CD64 y las células MHCII⁻ (monocitos) en base a MerTK–Ly-6C y CCR2–Ly-6C.

Especialización funcional de las DCs

Con el fin de contribuir al estudio de la especialización funcional de las DCs relacionada con su potencial para inducir respuestas Th2 durante reacciones alérgicas, se realizó un análisis del perfil transcripcional de BMDCs estimuladas con HDM o LPS ([Figura 12, A](#)). A partir de las listas de genes inducidos en cada condición con respecto a un control sin estimular, se realizó un diagrama de Venn que mostró que existían un gran número de genes diferencialmente expresados en cada una de las condiciones y también co-expresados en varias condiciones ([Figura 12, B](#)). Pudieron definirse 127 genes inducidos más de 2.5 veces, tanto con HDM como con LPS ([Tabla 4](#)), 28 genes inducidos más de 2.5 veces únicamente con HDM ([Tabla 5](#)), y 260 genes inducidos más de 2.5 veces exclusivamente con LPS.

Con respecto a los genes que resultan inducidos tanto por HDM como por LPS, estos corresponden principalmente a citoquinas pro-inflamatorias (*tnf*, *il6*, *il12*), marcadores de activación (*cd69*) o quimioquinas (*cxc11*, *cxc12*, *cxc110*). El hecho de que, en las condiciones estimuladas con HDM, la inducción de estos genes se produzca a menor nivel, puede

deberse a la presencia de endotoxinas en los extractos del ácaro. Aunque también podría inducir estos genes algún alérgeno concreto del ácaro, ya que está descrito que el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* activa las BMDCs para producir cistein-leucotrienos de manera dectin-2 dependiente (Barrett et al., 2012).

Por otro lado, los genes que únicamente se inducían tras una estimulación con HDM y no lo hacían en respuesta a LPS se detallan en la [Tabla 5](#). El gen más expresado en este caso y el que nos suscitó mayor interés fue *il2*, debido a estudios previos que propusieron que las DCs del bazo producían IL-2 cuando se estimulaban con LPS, zimosán y bacterias (Granucci et al., 2003; Zelante et al., 2012), además de su conocido papel en la supervivencia de células T. Con el fin de comprobar si esta expresión estaba directamente ligada a una producción de la proteína, se analizó mediante ELISA la IL-2 presente en el sobrenadante de los cultivos de BMDCs estimulados con HDM o LPS ([Figura 12, C](#)). Nuestros datos confirmaron que las BMDCs eran capaces de producir y secretar al medio IL-2 tras la estimulación con HDM. Otro gen altamente inducido por HDM es *cc17*. CCL7 actúa como quimio-atrayente de monocitos, además de ser importante para el reclutamiento de eosinófilos y basófilos (Romagnani, 2002). Nuestros datos sugieren que en el entorno fisiológico de una respuesta alérgica frente a HDM, las DCs pulmonares acondicionadas por HDM pueden reclutar eosinófilos a través de CCL7 y promover la supervivencia y proliferación de células T por medio de IL-2.

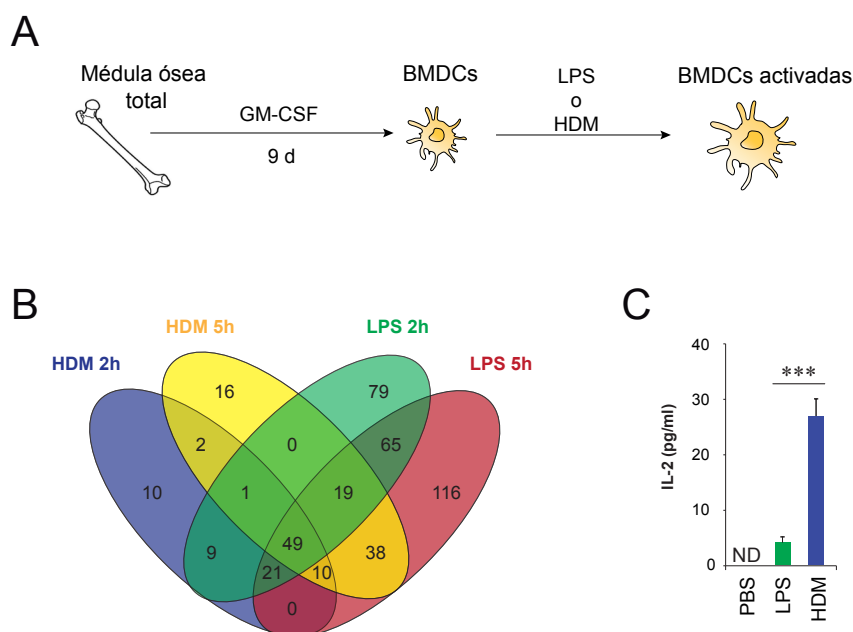


Figura 12. Análisis de la especialización funcional de BMDCs estimuladas con HDM *in vitro*. **A.** Protocolo utilizado para la obtención de BMDCs y su posterior activación *in vitro*. Se cultivó la médula ósea total en presencia de GM-CSF durante 9 días, realizando cambios de medio cada 3 días. Las BMDCs se aislaron por separación magnética y se estimularon con LPS o HDM. **B.** Diagrama de Venn obtenido a partir de las listas de genes sobre-expresados más de 2.5 veces para cada condición en relación a BMDCs sin estimular. Los números indican los genes presentes en cada región. **C.** Producción de IL-2, medida por ELISA, por las BMDCs después de 16h con el estímulo indicado.

Tabla 4. Genes sobre-expresados tanto por las BMDCs estimuladas con HDM como por las estimuladas con LPS.

Gene		Fold Induction			
		HDM 2h	HDM 5h	LPS 2h	LPS 5h
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	29.94	11.34	37.04	13.73
Tnfsf15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	18.61	12.94	31.47	21.78
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	14.44	5.55	13.38	10.53
Tnf	tumor necrosis factor	14.25	6.59	18.35	14
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	11	5.77	28.08	34.51
Ptx3	pentraxin related gene	9.95	6.46	10.62	8.43
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	8.48	5.48	18.03	29.5
Il1a	interleukin 1 alpha (Il1a)	8.46	4.22	12.81	19.85
Inhba	inhibin beta-A	8.3	5.98	9.72	9.09
Il6	interleukin 6	8.29	6.09	18.44	32.77
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	7.76	3.55	6.2	4.3
Il1b	interleukin 1 beta	7.74	3.75	10.12	10.35
Edn1	endothelin 1	7.6	4.53	9.09	5.03
Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast	7.29	-	9.73	5.54
Il12b	interleukin 12b	7.29	9.51	23.53	58.5
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	7.28	4.47	15.03	17.97
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	7.07	4.43	12.22	10.26
Rasgef1b	RasGEF domain family, member 1B	6.96	-	6.54	-
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	6.9	8.84	5.52	9.93
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	6.82	6.74	3.91	7.49
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	6.6	3.68	3.62	3.65
Cd69	CD69 antigen	5.45	-	4.48	3.33
Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	5.34	-	3.76	-
Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	5.34	-	11.17	3.33
Csf1	colony stimulating factor 1	5.14	-	4.67	-
Mnda	myeloid cell nuclear differentiation antigen	2.94	8.65	2.79	7.84
Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	2.63	6.78	-	6.39
Isg20	interferon-stimulated protein	-	6.74	-	5.55
Tgtp2	T cell specific GTPase 2	4.5	6.39	-	5.93
Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifie	3.36	6.38	5.68	10.45
Gm14446	predicted gene 14446	2.67	6.22	-	4.75
Gbp5	guanylate binding protein 5	4.13	6.02	7.19	9.56
Cmpk2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2	3.54	5.82	3.84	8.81
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	3.34	5.6	3.34	8.76
Ifi203	interferon activated gene 203	-	5.17	-	4.12
Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	3.84	5.1	5.59	7.2

Se muestran los genes inducidos más de 2,5 veces por ambos estímulos respecto a BMDCs sin estimular.

Tabla 5. Genes sobre-expresados únicamente por las BMDCs estimuladas con HDM.

Gene		Fold Induction	
		HDM 2h	HDM 5h
Il2	interleukin 2	6.6	-
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	6.15	-
Nfkbid	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, delta	3.71	-
Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	3.58	-
Rgcc	regulator of cell cycle	3.53	-
Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1	3	3.4
Odc1	ornithine decarboxylase, structural 1	2.93	-
E330037115Rik	hypothetical Proline-rich region profile containing protein	2.73	-
Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2	2.68	-
Gm12250	predicted gene 12250	2.63	-
AI607873	expressed sequence AI607873	2.57	-
Daxx	Fas death domain-associated protein	2.54	2.76
A_55_P2140745	Unknown	-	3.18
Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	-	3.11
Phf11b	PHD finger protein 11B	-	3.11
Clec2d	C-type lectin domain family 2, member d	-	3.05
Slfn4	schlafen 4	-	3.02
Mndal	myeloid nuclear differentiation antigen like	-	2.99
Oas1a	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	-	2.81
Trim30a	tripartite motif-containing 30A	-	2.78
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	-	2.69
Pml	promyelocytic leukemia	-	2.69
Nmi	N-myc (and STAT) interactor	-	2.61
Pnp	purine-nucleoside phosphorylase	-	2.6
Pttg1	pituitary tumor-transforming gene 1	-	2.6
Sp110	Sp110 nuclear body protein	-	2.54
Gm4951	predicted gene 4951	-	2.52
Lap3	leucine aminopeptidase 3	-	2.51

Se muestran los genes que se inducen más de 2,5 veces por HDM, y no por LPS, respecto a BMDCs sin estimular.

Impacto de la deficiencia de CCR2 en las poblaciones leucocitarias pulmonares durante la respuesta alérgica frente a HDM

Análisis de la reacción alérgica frente a HDM en ratones CCR2^{-/-}

Con el objetivo de abordar en profundidad la contribución de los monocitos Ly-6C^{high} a la generación de DCs y MØs pulmonares durante el proceso alérgico, se analizaron

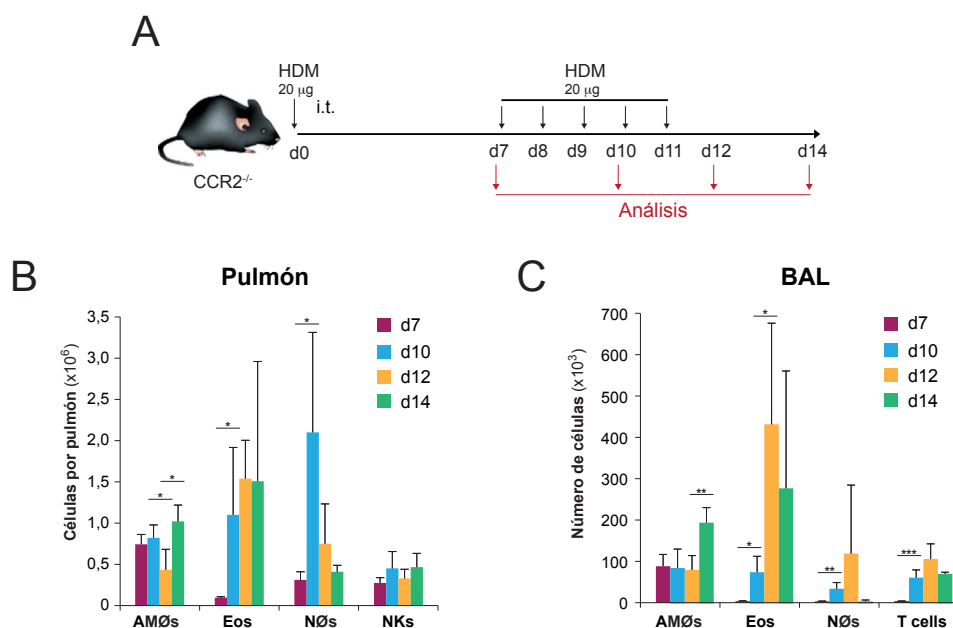


Figura 13. Protocolo de alergia frente a HDM en ratones CCR2^{-/-}. **A.** Modelo experimental que consiste en una primera inoculación de HDM i.t. a día 0 y 5 inoculaciones consecutivas los días 7, 8, 9, 10 y 11. El análisis fenotípico se llevará a cabo los días 7, 10, 12 y 14 del protocolo. **B.** Cuantificación a los tiempos indicados de las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos y células NK en los pulmones de ratones CCR2^{-/-} expuestos a HDM. **C.** Cuantificación de las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos y células T en el BAL de ratones CCR2^{-/-} expuestos a HDM.

ratones CCR2^{-/-} en fondo genético C57BL/6, durante la alergia inducida por HDM (Figura 13, A). El número de AMØs sufría un descenso a día 12 (Figura 13, B) que no ocurría en el caso de los ratones control (Figura 8, B), lo cual podría sugerir que en ese punto la generación de AMØs era dependiente de monocitos o de algún otro precursor CCR2 dependiente. El número de eosinófilos pulmonares aumentaba significativamente durante el proceso de alergia en los ratones CCR2^{-/-} tanto en el pulmón (Figura 13, B) como en el BAL (Figura 13, C), y además, en mayor medida que en los ratones control (Figura 8, B). Esto sugiere que los ratones deficientes para CCR2 tenían problemas para controlar la alergia, lo que se tradujo en una mayor infiltración de eosinófilos. Finalmente, el número de neutrófilos también era mayor en los ratones CCR2^{-/-} (Figura 13, B).

Variaciones en el sistema monocítico-DC-macrofágico pulmonar en ratones CCR2^{-/-} durante la respuesta alérgica frente a HDM

De la misma forma que para los ratones control en los ratones CCR2^{-/-}, se identificaron ambos tipos de cDCs (CD11b⁺ y CD103⁺), monocitos (Ly-6C^{hi} y Ly-6C^{low}), moDCs y iMØs (Figura 14, A).

La deficiencia en CCR2 no afectó al número de monocitos Ly-6C^{low} ni de iMØs, supuso una reducción moderada tanto en las cDCs CD11b⁺ como en las cDCs CD103⁺, y un fuerte descenso en el número de monocitos Ly-6C^{high} y moDCs (Figura 14, B).

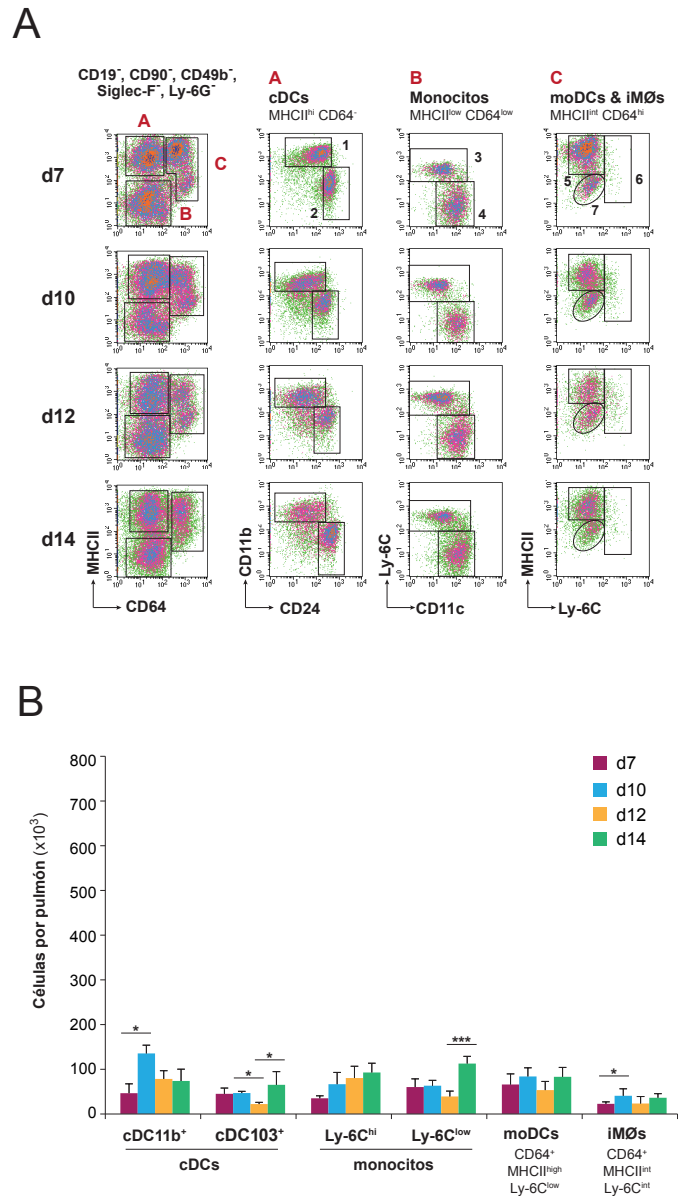


Figura 14. Caracterización de las poblaciones monocítico-DC-macrofágicas pulmonares durante un proceso alérgico frente a HDM en ratones *CCR2*^{-/-}. A. Estrategia de análisis para la caracterización de cDCs (MHCII^{hi} CD64⁻), monocitos (MHCII^{low} CD64^{low}) y moDCs/iMØs (MHCII^{int} CD64^{hi}) los días 7, 10, 12 y 14 del proceso alérgico. La región de cDCs incluía cDCs CD11b⁺ (1) y cDCs CD103⁺ (2). Los monocitos se subdividían en Ly-6C^{hi} (3) y Ly-6C^{low} (4). Las células MHCII^{int} CD64^{hi} incluían iMØs (7), i-moDCs (6) y moDCs (5). **B.** Cuantificación de cDCs, monocitos, moDCs y iMØs pulmonares en ratones *CCR2*^{-/-} expuestos a HDM.

Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} en ratones *CCR2*^{-/-} durante la respuesta alérgica frente a HDM

El análisis de la transición desde monocitos Ly-6C^{high} a moDCs, reveló que en los ratones *CCR2*^{-/-} el bloqueo en el reclutamiento de monocitos Ly-6C^{high} iba parejo con una capacidad limitada de diferenciación a moDCs (Figura 15, A), tal y como mostró el reducido número de células en la región de P2 (Figura 15, B). Por lo tanto, los datos obtenidos a partir de los ratones *CCR2*^{-/-} confirmaron que durante el proceso alérgico el reclutamiento

de monocitos Ly-6C^{high} al pulmón era dependiente de CCR2, y que los monocitos Ly-6C^{high} se diferenciaban localmente a moDCs. Asimismo, estos resultados sugerían que los monocitos Ly-6C^{high} pulmonares no se diferenciaban en monocitos Ly-6C^{low} ni en iMØs durante el proceso alérgico frente a HDM.

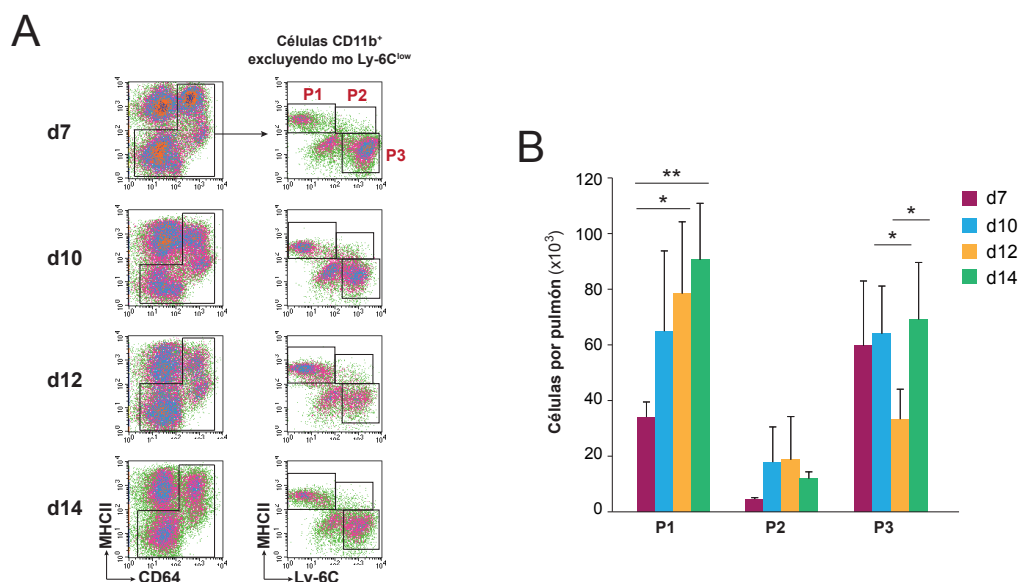


Figura 15. Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} durante la respuesta alérgica frente a HDM en ratones CCR2^{-/-}. **A.** La cascada de diferenciación monocítica se ha establecido excluyendo cDCs y monocitos Ly-6C^{low} del gráfico MHCII Vs CD64. Los monocitos corresponden a P1, las i-moDCs a P2 y las moDCs a P3. **B.** Cuantificación de las poblaciones P1, P2 y P3 durante la reacción alérgica frente a HDM en ratones CCR2^{-/-}.

Expresión de CCR2 por parte de las cDCs

El hecho de que la deficiencia de CCR2 causara una reducción en el número de cDCs, nos llevó a analizar su expresión de CCR2 durante el proceso alérgico (Figura 16, A). Comúnmente se ha utilizado este marcador para diferenciar moDCs de cDCs CD11b⁺, siendo las moDCs CCR2⁺ por su linaje monocítico (Tamoutounour et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012). Tanto en reposo como a día 7, alrededor del 50% de las cDCs CD11b⁺ expresaban CCR2, y la mayoría de las cDCs CD103⁺, alrededor de un 80%, eran CCR2⁺ (Figura 16, B). De día 7 a día 10, el porcentaje de células cDCs CD11b⁺ CCR2⁺ disminuyó hasta un 20% aunque durante los tiempos sucesivos se recuperaron progresivamente los valores existentes a día 7. La reducción en las cDCs CD103⁺ CCR2⁺ fue todavía más dramática: de un 80% a día 7 hasta un 20% a día 10 (Figura 16, A). Esta reducción transitoria en el porcentaje de cDCs CD103⁺ CCR2⁺ podría deberse a una internalización del receptor inducida por la unión de su ligando CCL2 (MCP-1), tal y como está descrito para los monocitos Ly-6C^{high} (Mack et al., 2001), o a la migración de las cDCs CCR2⁺ a los M-LNs drenantes. En este sentido, el hecho de que el número absoluto de las cDCs CD103⁺ disminuyera significativamente de día 7 a día 10 sugiere que esta subpoblación de DCs migre a los ganglios drenantes (Figura 16, C). Estos datos indicaban

que, mientras que durante una reacción alérgica la expresión de CCR2 permite distinguir las cDCs CD11b⁺ de las moDCs, en una situación de reposo se necesitarán marcadores adicionales ya que un alto porcentaje de cDCs expresan CCR2 en el pulmón.

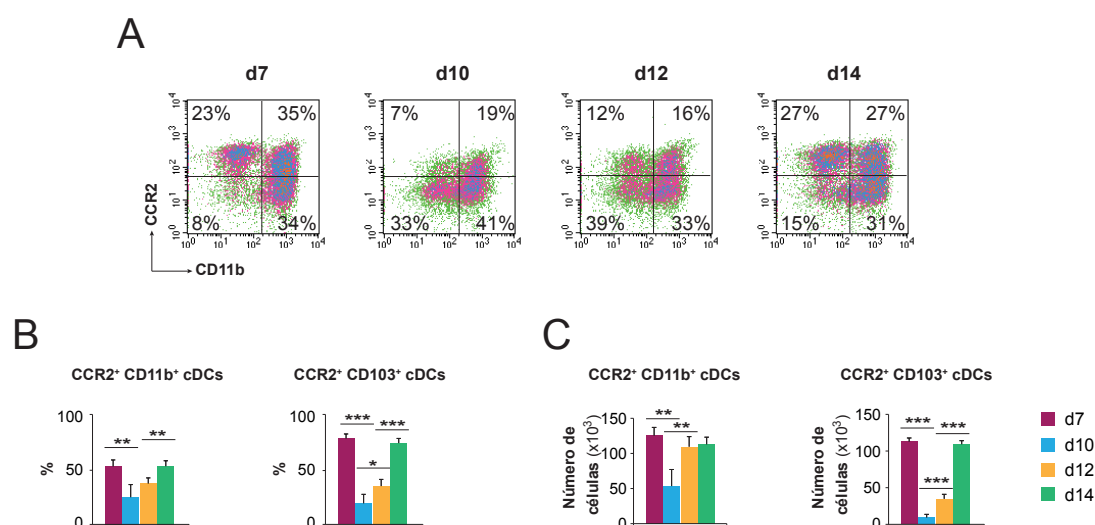


Figura 16. Expresión de CCR2 por las subpoblaciones de cDCs. A. Expresión de CCR2 en las cDCs CD11b⁺ y CD11b⁻ analizadas en la región MHCII⁺ CD64⁻ a diferentes tiempos durante el proceso alérgico. Se indican los porcentajes para cada cuadrante. **B.** Porcentaje de células CCR2⁺ dentro las cDCs CD11b⁺ y CD11b⁻ durante la respuesta alérgica inducida por HDM. **C.** Número absoluto de células cDCs CD11b⁺ CCR2⁺ y cDCs CD103⁺ CCR2⁺ a diferentes tiempos del proceso alérgico.

Regulación de la respuesta alérgica por células de origen monocítico

Impacto de la deficiencia de CCR2 en la regulación de la respuesta alérgica frente a HDM

El análisis de los ratones CCR2^{-/-} nos indicó que, además de tener afectadas las poblaciones monocíticas, experimentaban un mayor reclutamiento de eosinófilos al pulmón (Figura 17, A) y una mayor infiltración de eosinófilos al espacio alveolar (Figura 17, B) que los ratones control C57BL/6. La respuesta Th2 específica tiene lugar en los ganglios que drenan el pulmón, los M-LNs. Con el objetivo de abordar si una mayor infiltración de eosinófilos reflejaba una respuesta Th2 más fuerte, se realizaron experimentos destinados a evaluar la reacción alérgica en los M-LNs. Para ello, se extrajeron los M-LNs a día 14, se realizó una suspensión celular que se cultivó *in vitro* durante 4 días en presencia o ausencia de HDM. Pasado este tiempo, se analizó la producción de IL-4, IL-5 e IFN- γ en el sobrenadante de los cultivos, mediante ELISA (Figura 17, C). Los M-LNs de los ratones CCR2^{-/-} produjeron mayor cantidad de IL-5 y menor cantidad de IFN- γ que los M-LNs de los ratones C57BL/6 cuando se estimularon con HDM *in vitro* (Figura 17, D). Esto indica que los ratones CCR2^{-/-} desarrollaron un mayor grado de alergia, no sólo a nivel de infiltración de eosinófilos, sino también a nivel de producción de citoquinas Th2 en los M-LNs.

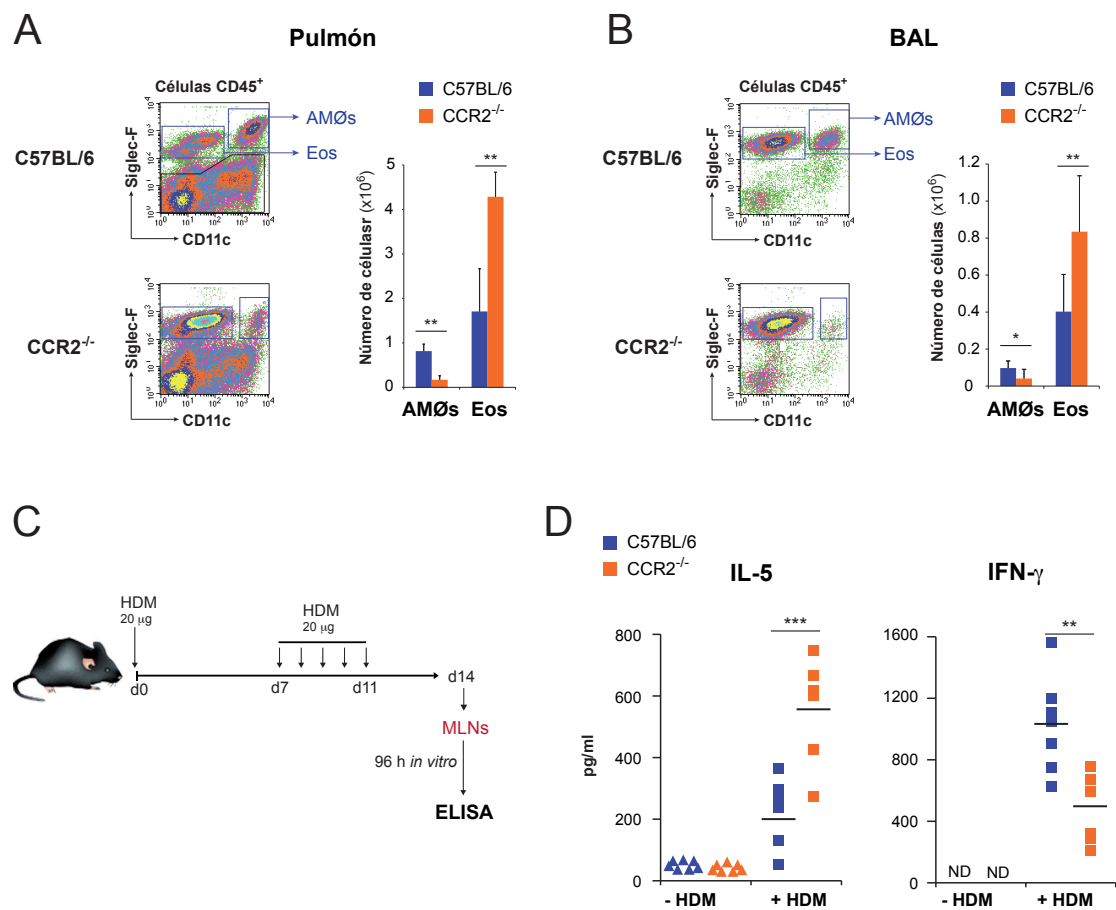


Figura 17. Los ratones CCR2^{-/-} desarrollan una mayor respuesta alérgica frente a HDM. **A.** Cuantificación del número de AMØs y eosinófilos, definidos en base a Siglec-F y CD11c, en los pulmones de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-} a día 14. **B.** Cuantificación del número de AMØs y eosinófilos en el BAL de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-} a día 14. **C.** Protocolo para la cuantificación de citoquinas producidas por los M-LNs estimulados 96h *in vitro* en ausencia o presencia de 15 µg HDM. **D.** Cuantificación mediante ELISA de IL-5 e IFN-γ producidos por las células de los M-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-}.

Impacto de la deficiencia de IFNAR en la regulación de la respuesta alérgica frente a HDM

Los ratones IFNAR^{-/-} tienen un defecto en la subunidad α del receptor para IFN-α e IFN-β y por lo tanto, sus células no responden a IFN-I. Teniendo en cuenta que los ratones IFNAR^{-/-} tienen afectada tanto la diferenciación de monocitos Ly-6C^{hi}, como su reclutamiento al pulmón en un modelo de infección por el virus de la gripe (Seo et al., 2011), se ha utilizado este modelo para confirmar los datos obtenidos en los ratones CCR2^{-/-}. En primer lugar se analizaron las poblaciones de monocitos y DCs pulmonares en reposo. Nuestros resultados confirmaron que los pulmones de los ratones IFNAR^{-/-} tienen un defecto en monocitos Ly-6C^{hi}, además de tener reducido el número de moDCs y cDCs CD103⁺ en reposo (Figura 18). Por otra parte, durante una reacción alérgica frente a HDM (Figura 19, A), el análisis del número de eosinófilos en el pulmón (Figura 19, B) y en el BAL (Figura 19, C) nos mostró un aumento de la infiltración de eosinófilos durante la respuesta alérgica, especialmente entre día 7 y día 10, que era mayor que el aumento observado en los ratones C57BL/6 (Figura 8, B y C).

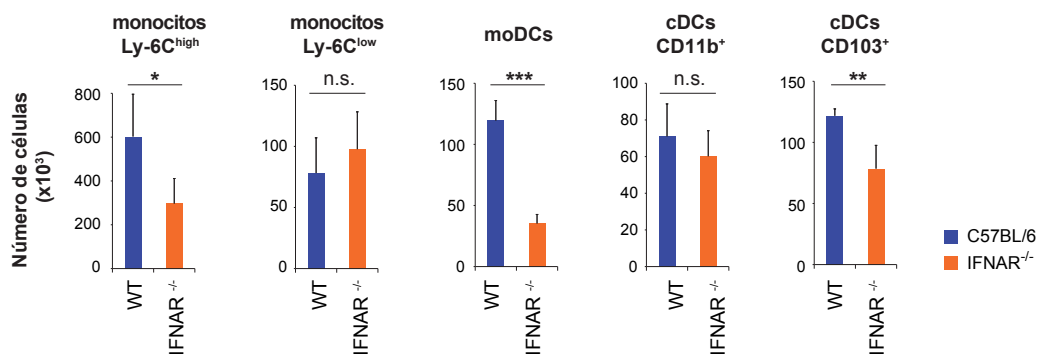


Figura 18. Cuantificación de las poblaciones de monocitos y DCs en ratones C57BL/6 e IFNAR^{-/-} en reposo.

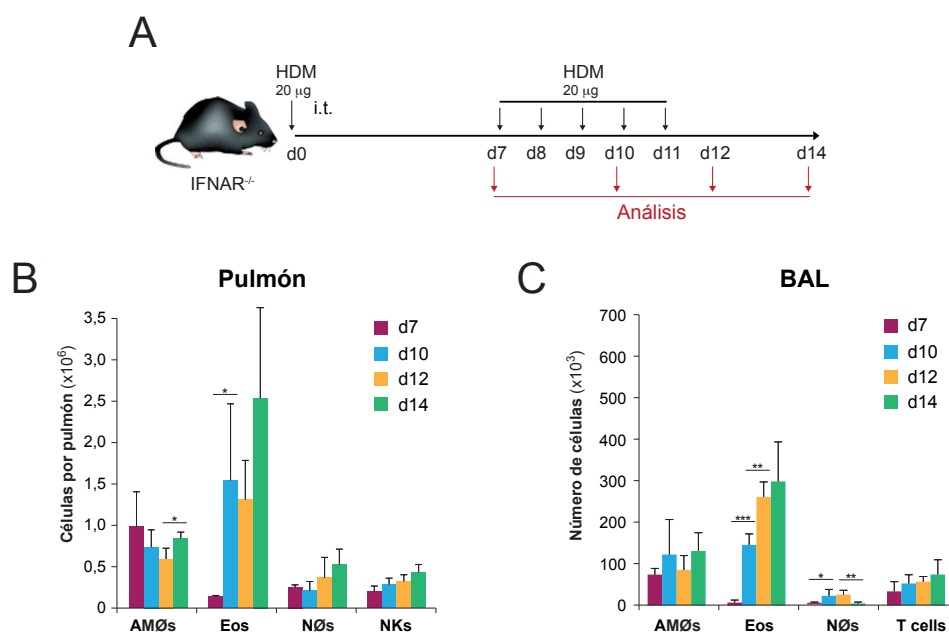


Figura 19. Protocolo de alergia frente a HDM en ratones IFNAR^{-/-}. **A.** Modelo experimental que consiste en una primera inoculación de HDM i.t. a día 0 y 5 inoculaciones consecutivas los días 7, 8, 9, 10 y 11; el análisis fenotípico se llevará a cabo los días 7, 10, 12 y 14 del protocolo. **B.** Cuantificación a los tiempos indicados de las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos y células NK en los pulmones de ratones IFNAR^{-/-} expuestos a HDM. **C.** Cuantificación de las poblaciones de AMØs, eosinófilos, neutrófilos y células T en el BAL de ratones IFNAR^{-/-} expuestos a HDM.

De igual forma que para el análisis de los ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-}, se analizaron las cDCs CD11b⁺ y CD103⁺, los monocitos Ly-6C^{hi} y Ly-6C^{low}, las moDCs y los iMØs (Figura 20, A). La deficiencia en IFNAR no afectó al número de cDCs, monocitos Ly-6C^{low} ni de iMØs, pero supuso una reducción en el número de monocitos Ly-6C^{high} a tiempos cortos, y en menor medida a día 12 y día 14, y un descenso en las moDCs (Figura 20, B). Al igual que en el caso de los ratones CCR2^{-/-}, el análisis de la transición monocito-moDC reveló

que los ratones IFNAR^{-/-} tenían también defectos en su capacidad para generar moDCs (Figura 21, A), tal y como reveló el reducido número de células en la región de P2 (Figura 21, B). Por lo tanto, los datos obtenidos a partir de los ratones IFNAR^{-/-} nos indicaron que tenían afectado el reclutamiento de monocitos Ly-6C^{high} al pulmón y su diferenciación a moDCs durante el proceso alérgico frente a HDM.

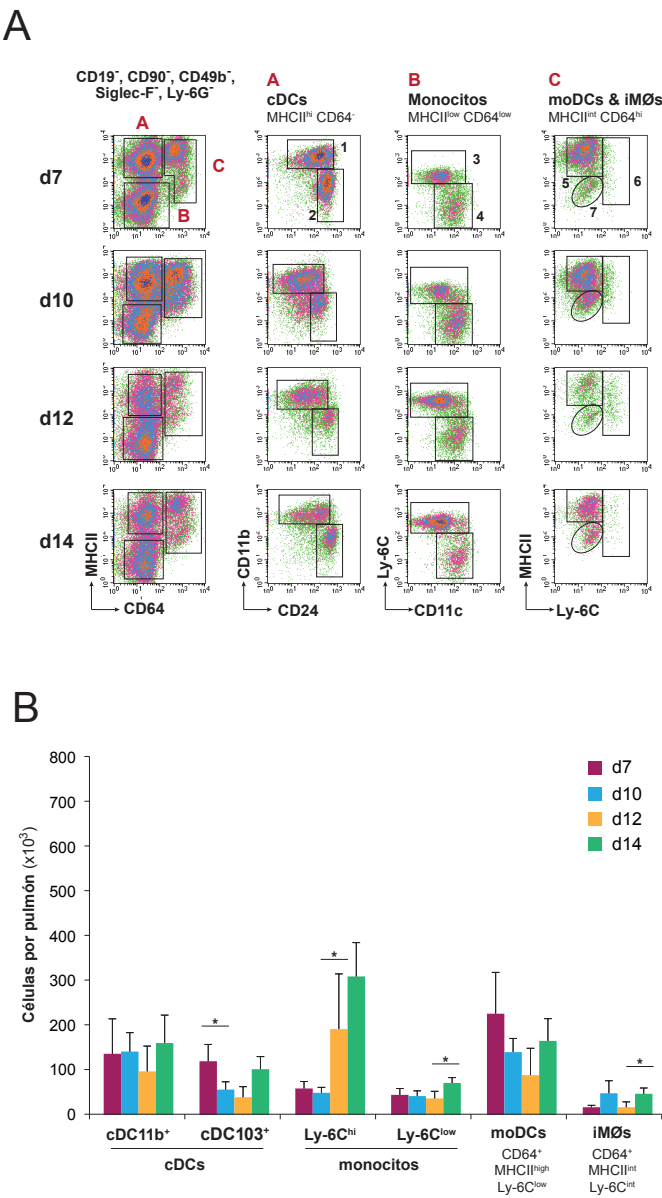


Figura 20. Caracterización de las poblaciones monocítico-DC-macrofágicas pulmonares durante un proceso alérgico frente a HDM en ratones IFNAR^{-/-}. **A.** Estrategia de análisis para la caracterización de cDCs (MHCII^{hi} CD64⁻), monocitos (MHCII^{low} CD64^{low}) y moDCs/iMØs (MHCII^{int} CD64^{hi}) los días 7, 10, 12 y 14 del proceso alérgico. La región de cDCs incluía cDCs CD11b⁺ (1) y cDCs CD103⁺ (2). Los monocitos se subdividían en Ly-6C^{hi} (3) y Ly-6C^{low} (4). Las células MHCII^{int} CD64^{hi} incluían iMØs (7), i-moDCs (6) y moDCs (5). **B.** Cuantificación de cDCs, monocitos, moDCs y iMØs pulmonares en ratones IFNAR^{-/-} expuestos a HDM.

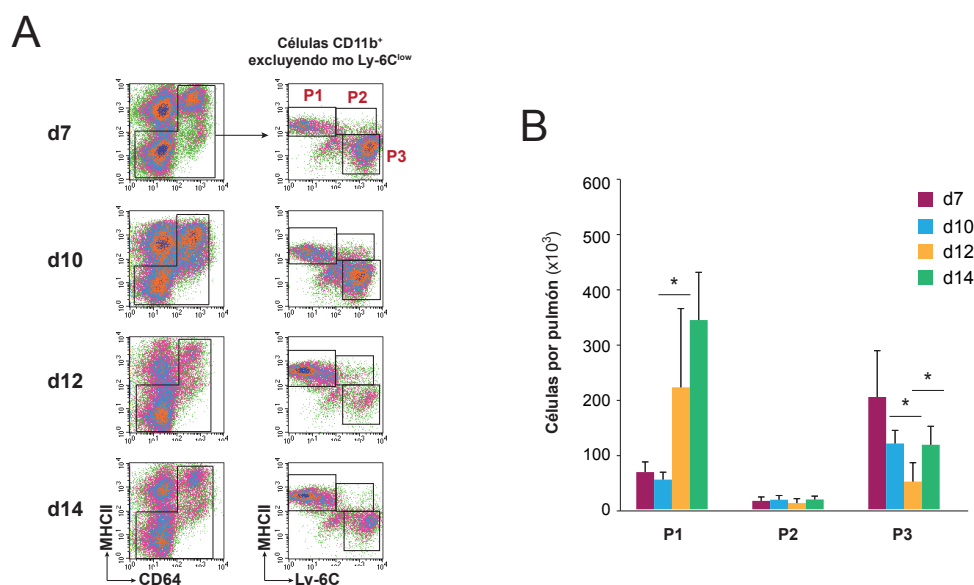


Figura 21. Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} durante la respuesta alérgica frente a HDM en ratones IFNAR^{-/-}. **A.** La cascada de diferenciación monocítica se ha establecido excluyendo cDCs y monocitos Ly-6C^{low} del gráfico MHCII Vs CD64. Los monocitos corresponden a P1, las i-moDCs a P2 y las moDCs a P3. **B.** Cuantificación de las poblaciones P1, P2 y P3 durante la reacción alérgica inducida por HDM en ratones IFNAR^{-/-}.

Finalmente, para validar los datos obtenidos en los ratones CCR2^{-/-} en cuanto a su mayor respuesta alérgica frente a HDM, se analizó la reacción alérgica en los M-LNs (Figura 22, C). Los ratones IFNAR^{-/-} desarrollaron mayor alergia en términos de producción de IL-5 (Figura 22, D); lo cual confirma que la carencia de monocitos conlleva un mayor desarrollo de alergia frente a HDM.

Cinética de las poblaciones alveolares

Tal y como se ha descrito en la Introducción, los AMØs constituyen una población de especial relevancia en la fisiología del pulmón. En reposo, el 90-95% de las células alveolares son AMØs, siendo los linfocitos T alrededor de un 5%. Tras un evento inflamatorio, se reclutan nuevas células como eosinófilos o neutrófilos que pueden llegar a suponer el 80-90% de las células totales del BAL.

Cinética de los AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM

Se estima que existe únicamente un AMØ cada 3 alvéolos (Westphalen et al., 2014). Los AMØs interactúan con el epitelio a través de CD200R, al expresar CD200 las células epiteliales de tipo II (Snelgrove et al., 2008); TGFβ unido a su receptor, el cual a su vez se une a la integrina αvβ6 (Soroosh et al., 2013); y formando uniones estrechas por medio de Cx43 (Westphalen et al., 2014). Tras realizar un lavado bronqueo-alveolar sólo obtenemos un 10% de los AMØs totales, el resto se quedan adheridos al parénquima y los detectamos en la suspensión pulmonar. Durante la reacción alérgica frente a HDM, se observó que los AMØs sufrían alteraciones en su perfil de FSC-SSC. A día 7, la mayoría de los AMØs

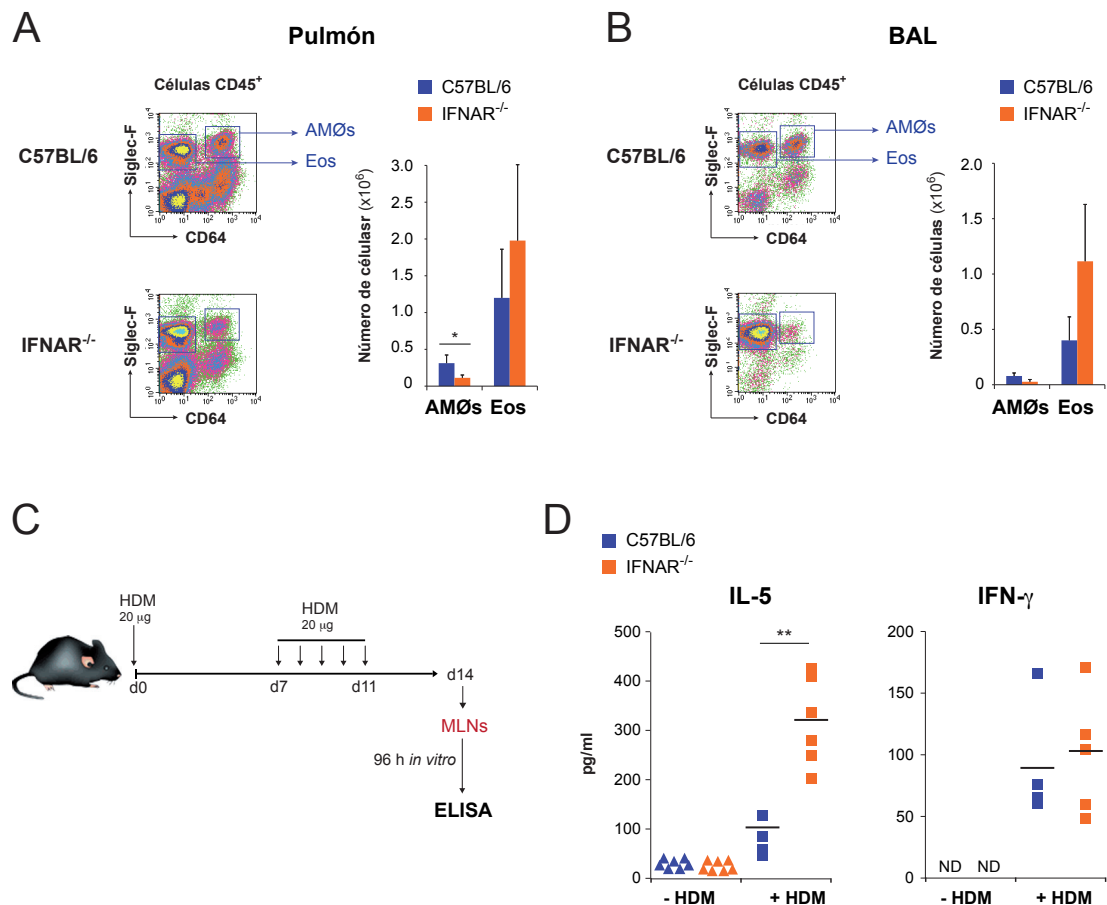


Figura 22. Los ratones IFNAR^{-/-} desarrollan una mayor respuesta alérgica frente a HDM.
A. Cuantificación del número de AMØs y eosinófilos, definidos en base a Siglec-F y CD11c, en los pulmones de ratones C57BL/6 e IFNAR^{-/-} a día 14. **B.** Cuantificación del número de AMØs y eosinófilos en el BAL de ratones C57BL/6 e IFNAR^{-/-} a día 14. **C.** Protocolo para la cuantificación de citoquinas producidas por las células de los M-LNs estimulados 96h *in vitro* en ausencia o presencia de 15 µg HDM. **D.** Cuantificación mediante ELISA de IL-5 e IFN-γ producidos por las células de los M-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-}.

tenían un FSC alto y un SSC bajo tanto en el pulmón como en el BAL. En un análisis por FACS, los AMØs con este perfil se incluyeron en la región R1 (Figura 23, A). Conforme avanzaba la reacción alérgica, se observó que los AMØs disminuían su FSC y aumentaban su SSC (región R2) (Figura 23, A), características asociadas con un estado pre-apoptótico (Pellicciari et al., 1993). El número total de AMØs en el pulmón experimentó un incremento a día 12 (Figura 23, B). El número de AMØs en R1 no experimentó variaciones importantes en el pulmón (Figura 23, C). Sin embargo, los AMØs en R2 aumentaron progresivamente con el tiempo (Figura 23, D). En el BAL los AMØs pertenecientes a R1 eran casi imperceptibles a tiempos largos (Figura 23, C), y la mayoría pertenecían a R2. Esto sugiere que los AMØs pre-apoptóticos perdían su capacidad de adherencia y eran más fácilmente recuperables en el BAL (Figura 23, D). También se analizó el porcentaje de AMØs apoptóticos para intentar correlacionar el mayor grado de degeneración en el perfil de FSC/SSC con una mayor tasa de apoptosis. Los datos de AMØs Annexina⁺ en el pulmón permanecían constantes (Figura 23, E). Sin embargo, los AMØs Annexina⁺ en el BAL aumentaron considerablemente entre día 7 y día 12 (Figura 23, F). Los datos de apoptosis en el BAL sugerían que los AMØs apoptóticos se desprendían del epitelio pulmonar detectándose en el lavado.

Para intentar determinar el mecanismo por el que se producía un incremento en el número de los AMØs durante la alergia frente a HDM, se analizó su proliferación mediante el análisis de la expresión de Ki-67, una proteína del ciclo celular expresada durante la fase de mitosis. Los porcentajes de AMØs Ki-67⁺ en el pulmón no experimentaron cambios significativos durante la reacción alérgica (Figura 23, G) lo que indica que la tasa proliferativa de los AMØs se mantenía constante. Por lo tanto, el aumento observado en el número de AMØs no era debido a su proliferación.

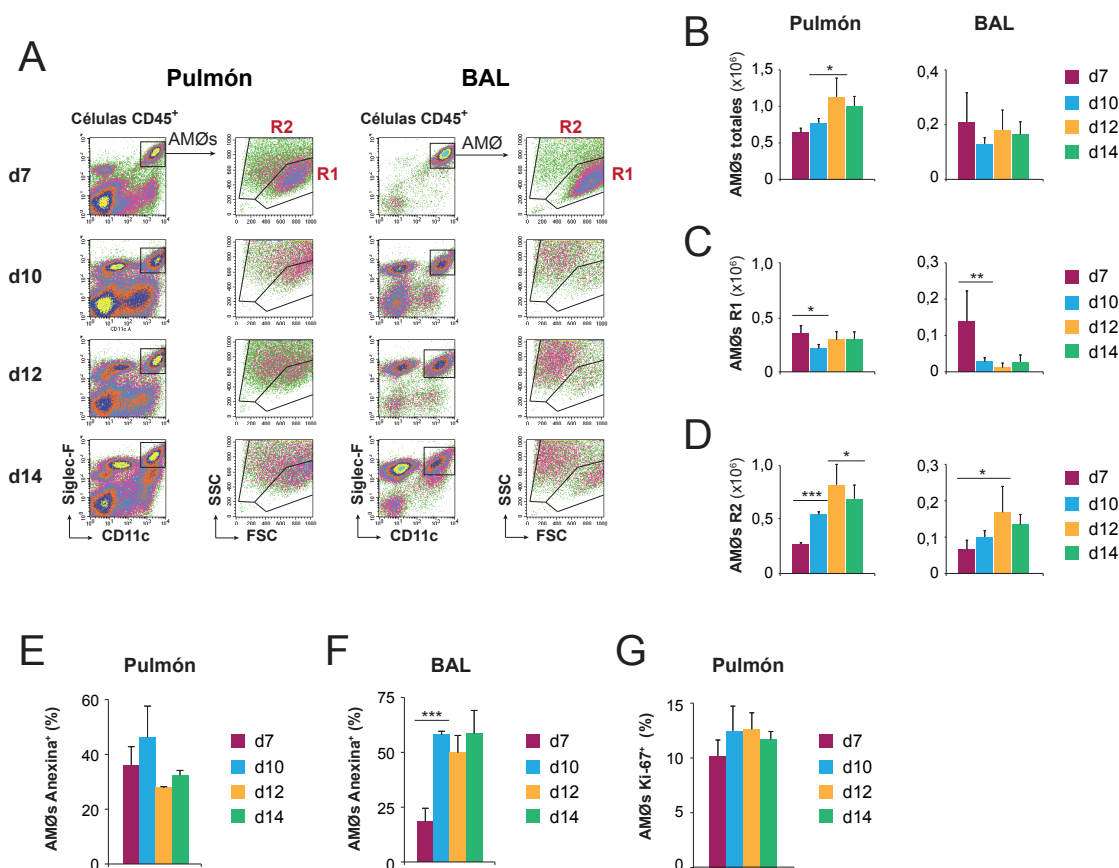


Figura 23. Los AMØs sufren un proceso de degeneración durante el transcurso de la reacción alérgica. **A.** Análisis del FSC-SSC de los AMØs a los tiempos indicados en el pulmón y en el BAL. R1 representa la población con mayor FSC y menor SSC, mientras que R2 es la región con menor FSC y mayor SSC. **B.** Cuantificación de los AMØs totales en el pulmón y en BAL a los tiempos indicados. **C.** Cuantificación de los AMØs presentes en R1 en el pulmón y en BAL a los tiempos indicados. **D.** Cuantificación de los AMØs presentes en R2 en el pulmón y en BAL a los tiempos indicados. **E.** Porcentaje de AMØs Anexina⁺ presentes en pulmón. **F.** Porcentaje de AMØs Anexina⁺ presentes en BAL. **G.** Porcentaje de AMØs Ki-67⁺ presentes en el pulmón.

Con el fin de confirmar las diferencias en el perfil de FSC/SSC de los AMØs, se analizaron preparaciones celulares del BAL, realizadas mediante citocentrifugación y teñidas con Giemsa, a diferentes tiempos del proceso alérgico. A día 7, los AMØs eran pequeños (10-15 µm de diámetro) y redondeados. El núcleo se localizaba en una posición excéntrica y su citoplasma, que presentaba un tamaño reducido en relación al volumen del núcleo, era simple y uniforme, con pocos gránulos en su mayoría. También se pudieron identificar algunos linfocitos e incluso alguna DC (Figura 24). A día 10, se observó una gran infiltración de eosinófilos con núcleos lobulados, indicando que podían ser eosinófilos

apoptóticos. La población de los AMØs era muy heterogénea; aunque seguían existiendo algunos AMØs pequeños, su citoplasma ya no era tan simple y comenzaban a presentar algunos gránulos. Otros AMØs eran más grandes (15-20 μm de diámetro), con un citoplasma con muchos gránulos y una membrana celular dañada e irregular (Figura 24). A día 12, se detectaron aún más eosinófilos y el número de AMØs grandes y con gránulos aumentó, indicando que a este tiempo, los AMØs estaban más dañados (Figura 24). A día 14 sin embargo, disminuyó el número de eosinófilos y se restableció casi por completo la morfología inicial de los AMØs, es decir, redondeados con un núcleo denso y un citoplasma sin gránulos, lo que sugería que podrían ser AMØs nuevos generados tras el proceso de alergia (Figura 24).

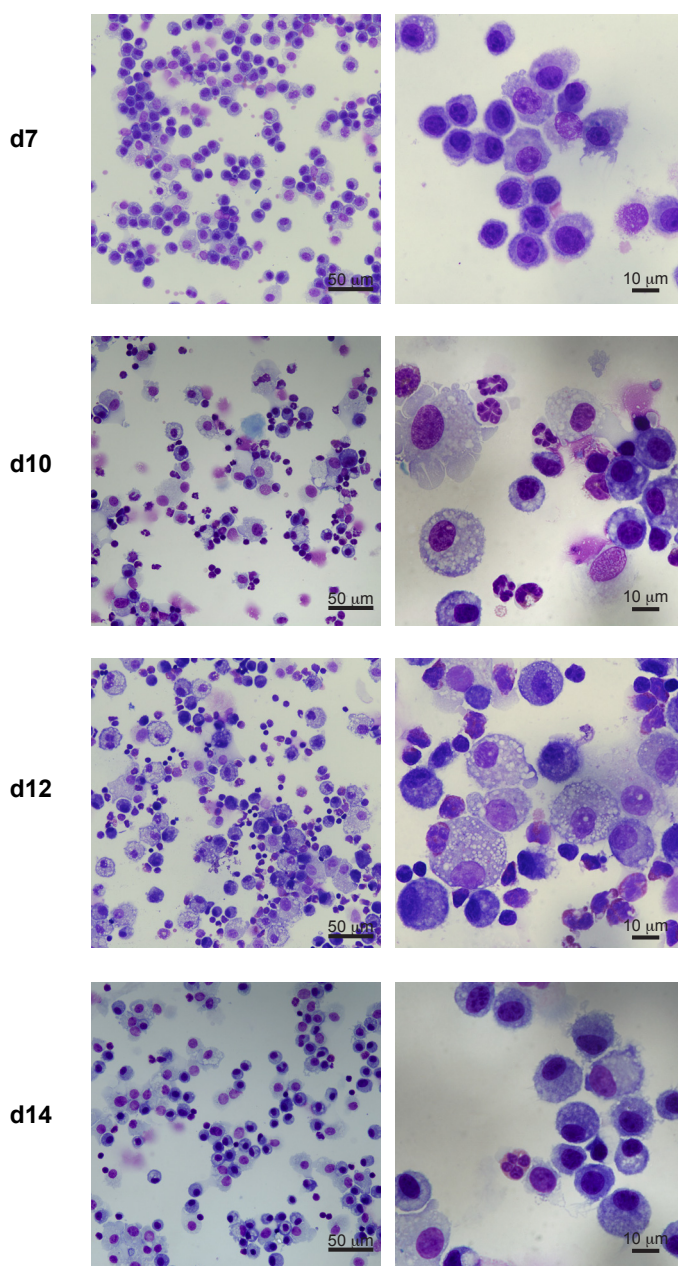


Figura 24. Degeneración de los AMØs durante la alergia inducida por HDM. Tinciones Giemsa de preparaciones citocentrifugadas de las suspensiones de BAL a los tiempos indicados. La columna de la izquierda corresponde a un aumento de 20x y la columna de la derecha a un aumento de 63x.

Cinética de los eosinófilos alveolares durante la respuesta alérgica frente a HDM

Durante una reacción alérgica frente a HDM, los eosinófilos totales aumentaron entre día 7 y día 12 tanto en el pulmón como en el BAL (Figura 25). En un pulmón en reposo los eosinófilos expresaban un nivel basal de Siglec-F, y se denominan Siglec-F^{low}. Durante los días sucesivos de la reacción alérgica, apareció una nueva población de eosinófilos que expresaban niveles más altos de Siglec-F, Siglec-F^{hi} (Figura 25, A). Al aumento en el número total de eosinófilos en el pulmón, contribuían tanto los eosinófilos Siglec-F^{low} como los eosinófilos Siglec-F^{hi} (Figura 25, B). En el BAL a día 7, apenas se detectaron eosinófilos, pero a medida que avanzaba la respuesta alérgica aparecieron eosinófilos Siglec-F^{hi}, sin embargo, no se detectaron eosinófilos Siglec-F^{low} a ningún tiempo (Figura 25).

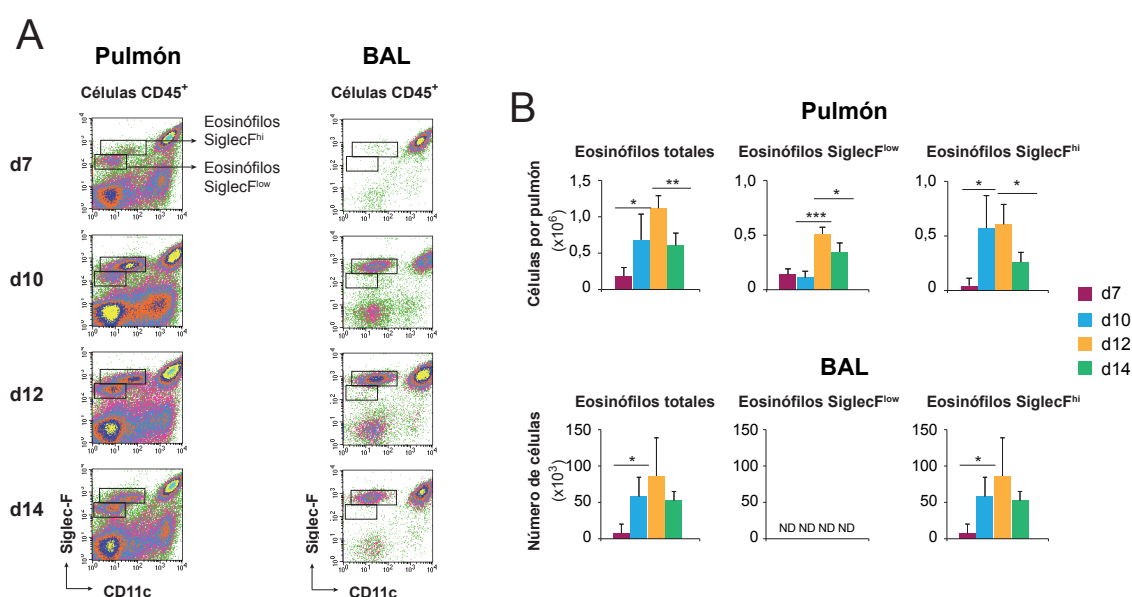
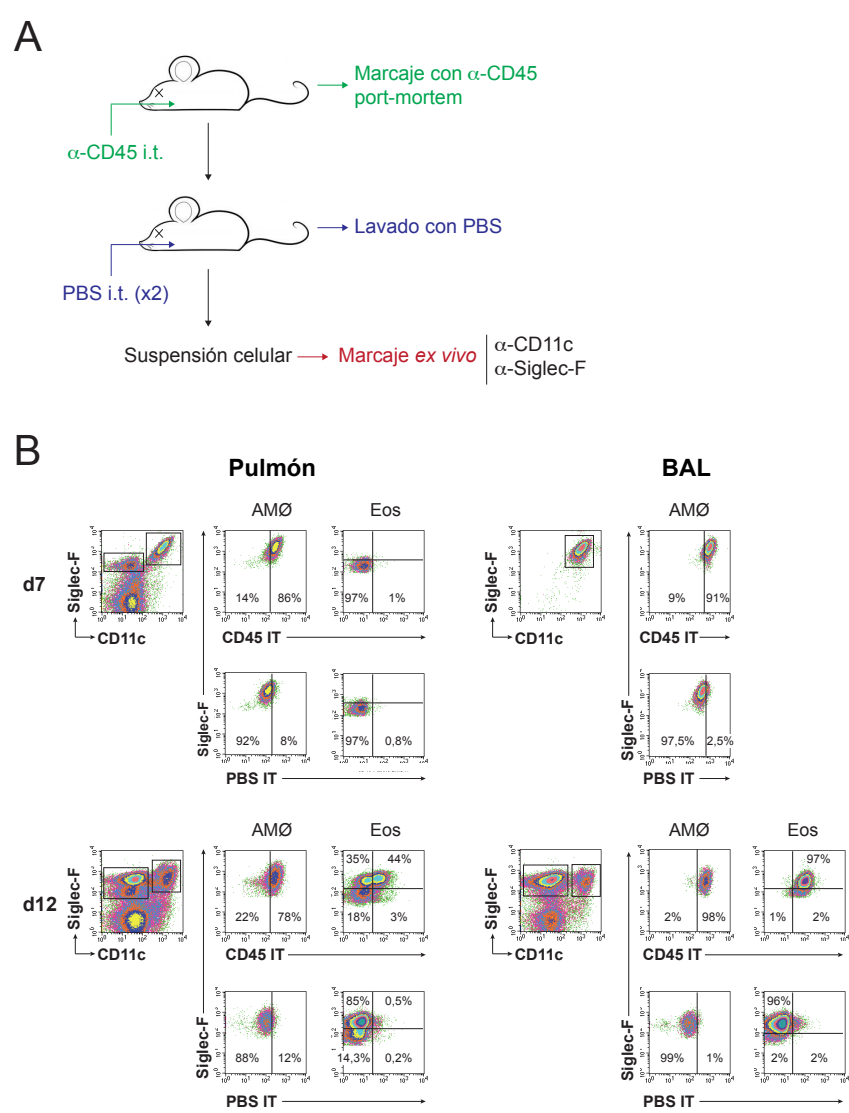


Figura 25. Dinámica de los eosinófilos durante la reacción alérgica inducida por HDM. **A.** Análisis de los eosinófilos en el pulmón y en el BAL, en base a Siglec-F y CD11c, a los tiempos indicados. **B.** Cuantificación de los eosinófilos totales, Siglec-F^{hi} y Siglec-F^{low} en el pulmón y en el BAL.

El hecho de que no se detectaran eosinófilos Siglec-F^{low} en el espacio alveolar sugiere que existen diferencias relativas a la localización de ambos tipos de eosinófilos. Para tratar de abordar esta cuestión, se realizó un marcaje post-mortem con α -CD45 conjugado con el fluorocromo Pacific Blue (PB). Se ha elegido α -CD45 porque todas las células hematopoyéticas expresan este marcador, de este modo, el anticuerpo tendrá acceso a las células localizadas en el interior de los alvéolos y aparecerán marcadas con el α -CD45. Para este fin, se inyectó un volumen de 1 ml de anticuerpo por la tráquea, a continuación se lavó dos veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo que pudiera quedar libre y se procesó para su posterior marcaje (Figura 26, A). Puesto que todos los AMØs se localizan en los alvéolos, tras la inyección i.t. del anticuerpo, todos los AMØs se marcaron con α -CD45, tanto a día 7 como a día 12 (Figura 26, B). A día 7 sólo se

detectó la población de eosinófilos Siglec-F^{low} en el pulmón y no presentaba marcaje para el anticuerpo α -CD45, lo que significaba que a día 7, la población de eosinófilos Siglec-F^{low} se encontraba únicamente en el parénquima pulmonar (Figura 26, B). A día 12, la población de eosinófilos Siglec-F^{hi} apareció marcada en su totalidad en el BAL, mientras que en el pulmón, alrededor del 50% de la población Siglec-F^{hi} era positiva para α -CD45 (Figura 26, B). Estos resultados indicaban que parte de los eosinófilos Siglec-F^{hi} se localizaban en el interior de los alvéolos, sugiriendo que eran los únicos que tenían capacidad para trasladarse al espacio alveolar. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para determinar si la población Siglec-F^{hi} deriva de la población Siglec-F^{low}. O si por el contrario, los eosinófilos Siglec-F^{hi} se reclutan desde la médula ósea al pulmón en forma activada.



Análisis de la inducción de apoptosis en los AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM

Los resultados expuestos en el apartado anterior nos llevaron a especular que una reacción alérgica más fuerte causaría una mayor tasa de apoptosis en los AMØs, lo que facilitaría el estudio de este proceso, así como de la regeneración de esta población tras la resolución del proceso alérgico. Para ello, basándonos en datos previos del grupo del Dr. Carlos Ardavín, se realizó un protocolo que consistía en la inyección i.p. de IL4-moDCs, que habían sido previamente estimuladas con HDM *in vitro* a día 0, y a continuación se inoculaban los ratones i.t. con 5 µg de HDM los días 7 y 11. Este protocolo induce una alergia más fuerte, tal y como indica el número de eosinófilos en el pulmón y en el BAL (Figura 27, E). El análisis de la desaparición y regeneración de los AMØs se llevó a cabo los días 7, 12, 20 y 28 (Figura 27, A).

A día 7, el fenotipo de los AMØs era similar al que habíamos observado al mismo tiempo durante protocolos de alergia más suaves, tanto en el pulmón como en el BAL (Figura 27, B). A día 12, la gran infiltración de eosinófilos, alrededor de un 40-50% del total de las células pulmonares, indicaba que los ratones desarrollaban un alto grado de alergia con este protocolo, además de la desaparición de los AMØs (Figura 27, B). Durante los días sucesivos de análisis, día 20 y día 28, vimos que la población de AMØs reaparecía, al mismo tiempo que disminuía la infiltración de eosinófilos (Figura 27, B). Sin embargo, la nueva población de AMØs poseía unas características fenotípicas diferentes a los AMØs pre-existentes. A día 7, los AMØs eran Siglec-F^{hi}, CD11c⁺, CD64^{int} y CD11b^{low} (Figura 27, C). La nueva población que observamos a día 20 era Siglec-F^{low}, CD11c^{hi}, CD64^{hi} y CD11b⁺ (Figura 27, C). A día 28, a medida que la respuesta alérgica disminuía, los marcadores analizados mostraban niveles de expresión intermedios entre el fenotipo a día 7 y día 20 (Figura 27, C), lo que permite suponer que a tiempos más tardíos, se restablecería el fenotipo inicial de los AMØs. Por otra parte, los números de AMØs mostraban que durante un protocolo de alergia exacerbado, la población desaparecía a día 12 y se recuperaba paulatinamente entre día 20 y día 28, hasta llegar cerca de los niveles iniciales (Figura 27, D). A día 28, el número de AMØs en el BAL no se había recuperado completamente (Figura 27, D), sugiriendo que la población de AMØs Siglec-F^{low} se originaba en el parénquima pulmonar y, a continuación, migraba al espacio alveolar, sin embargo harán falta experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis. Se analizó también el número de eosinófilos, como parámetro representativo de la reacción alérgica, y vimos que el pico de la respuesta tenía lugar a día 12, coincidiendo con la desaparición de los AMØs (Figura 27, E).

Se han publicado estudios en los que se propone que los AMØs transportan antígenos a los M-LNs durante un proceso infeccioso (Archambaud et al., 2010; Kirby et al., 2009). Para descartar que la desaparición de los AMØs a día 12 se debiera a un proceso de migración, se analizaron los M-LNs y se comprobó que, aunque existía una población claramente definida de eosinófilos reclutados al ganglio (MacKenzie et al., 2001), no se detectaron células Siglec-F⁺ CD11c⁺ que correspondieran a AMØs (Figura 27, F).

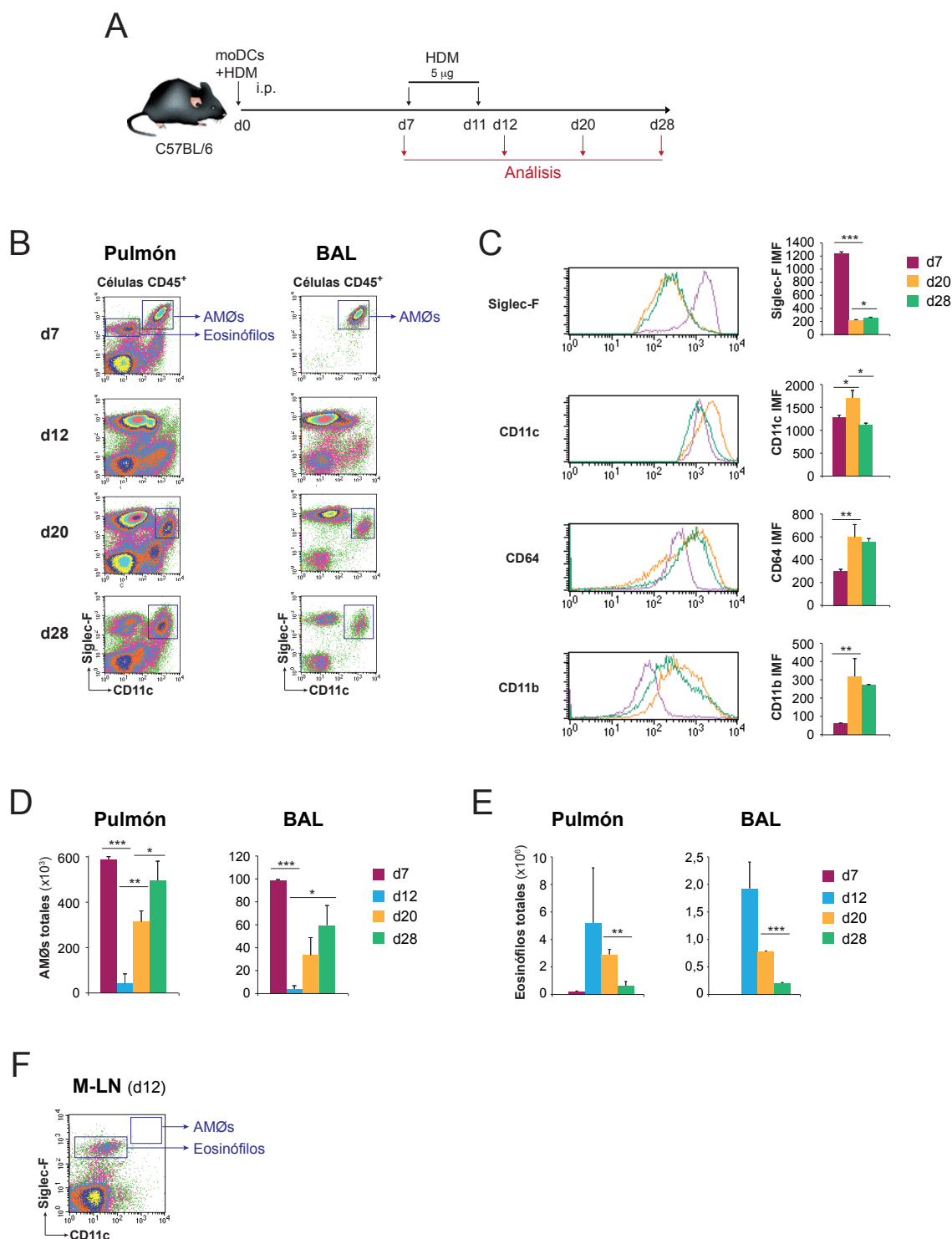
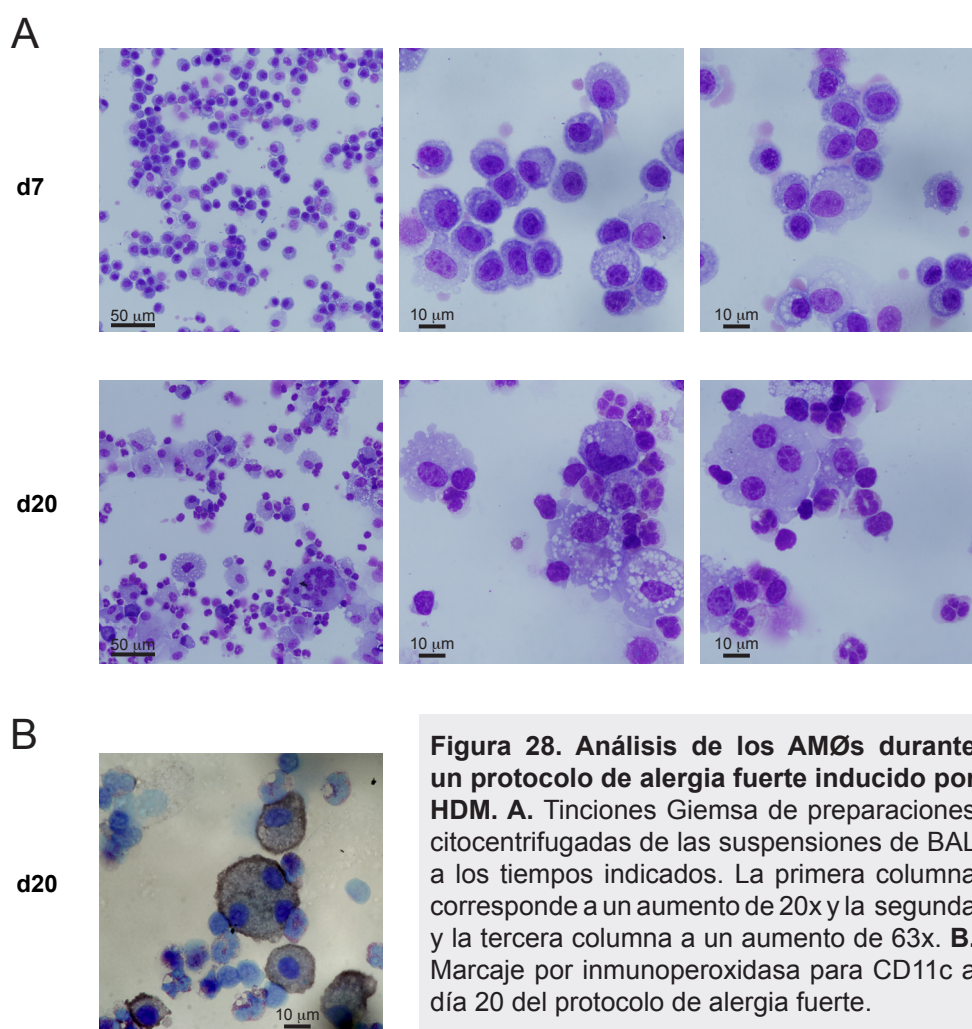


Figura 27. Análisis de desaparición y regeneración de los AMØs durante un proceso alérgico fuerte. A. Protocolo utilizado para desarrollar un mayor grado de alergia que implica la inyección i.p. de IL4-moDCs estimuladas con HDM a día 0 y dos inoculaciones i.t. a día 7 y día 11. El análisis se realizó los días 7, 12, 20 y 28. **B.** Análisis de los AMØs y eosinófilos en el pulmón y en el BAL, en base a Siglec-F y CD11c, a los tiempos indicados. **C.** Análisis y cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de Siglec-F, CD11c, CD64 y CD11b en la población de AMØs los días 7, 20 y 28. **D.** Cuantificación de los AMØs en el pulmón y en el BAL. **E.** Cuantificación de los eosinófilos totales en el pulmón y en el BAL. **F.** Marcaje para Siglec-F y CD11c en los M-LNs a día 12 que indica la ausencia de AMØs.

Por otro lado, el análisis de tinciones Giemsa sobre preparaciones cito-centrifugadas de las células del BAL, reveló que a día 7 la población mayoritaria en el BAL eran los AMØs, en su mayoría redondos y pequeños (10-15 μm de diámetro), con un citoplasma poco complejo y que apenas presentaban gránulos (Figura 28, A). A día 20, se apreciaba una gran infiltración de eosinófilos con núcleos lobulados, y los AMØs presentaban una morfología muy alterada. Los AMØs a este tiempo eran muy grandes, con un diámetro de unos 25 μm y que podía llegar incluso a los 50 μm en el caso de células con varios núcleos. Presentaban un gran número de gránulos en su citoplasma y su membrana plasmática era muy irregular, indicando su degeneración (Figura 28, A). Las células gigantes multinucleadas podían contener hasta 15 núcleos en su interior (Figura 28, A). Estas células podrían ser AMØs o células epiteliales que se hubieran desprendido de la pared a consecuencia del gran daño que sufrían estos ratones. Para intentar abordar la identidad de estas células gigantes multinucleadas se realizó un marcaje por inmunohistoquímica con un anticuerpo α -CD11c sobre preparaciones citocentrifugadas de día 20 y se reveló con peroxidada. Los resultados nos indicaron que las células multinucleadas era positivas para el marcaje de CD11c, y por lo tanto, correspondían a AMØs (Figura 28, B).



Análisis de la regeneración de los AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM

Estudios previos han propuesto que la regeneración de los AMØs durante un proceso infeccioso tiene lugar a partir de monocitos (Lee et al.; Liang et al., 2012). Para abordar esta hipótesis, se realizaron experimentos de transferencia de monocitos marcados con CFSE a día 18 y se analizó su contribución a las poblaciones pulmonares dos días más tarde (Figura 29, A). A ese tiempo, la población de AMØs endógena ya se había recuperado, aunque con fenotipo Siglec-F^{low}. Sin embargo, no se detectaron células CFSE⁺, derivadas de los monocitos inyectados, dentro de la región Siglec-F^{low} CD11c^{hi} (Figura 29, B). Se realizaron también experimentos inyectando a día 18 una fracción celular de médula ósea enriquecida en precursores mieloides tempranos y se analizó su contribución a día 20 (Figura 29, C). Del mismo modo que en el caso anterior, se detectaron los AMØs Siglec-F^{low} a día 20, pero las células CFSE⁺ no contribuyeron a dicha población (Figura 29, D). Estos resultados indican que es posible que exista un reservorio de precursores en el parénquima pulmonar, o que los tiempos de transferencia y de análisis no son los adecuados. De cualquier forma, se necesitaran experimentos adicionales para poder llegar a una conclusión sobre los precursores responsables de la regeneración de los AMØs durante reacciones alérgicas severas.

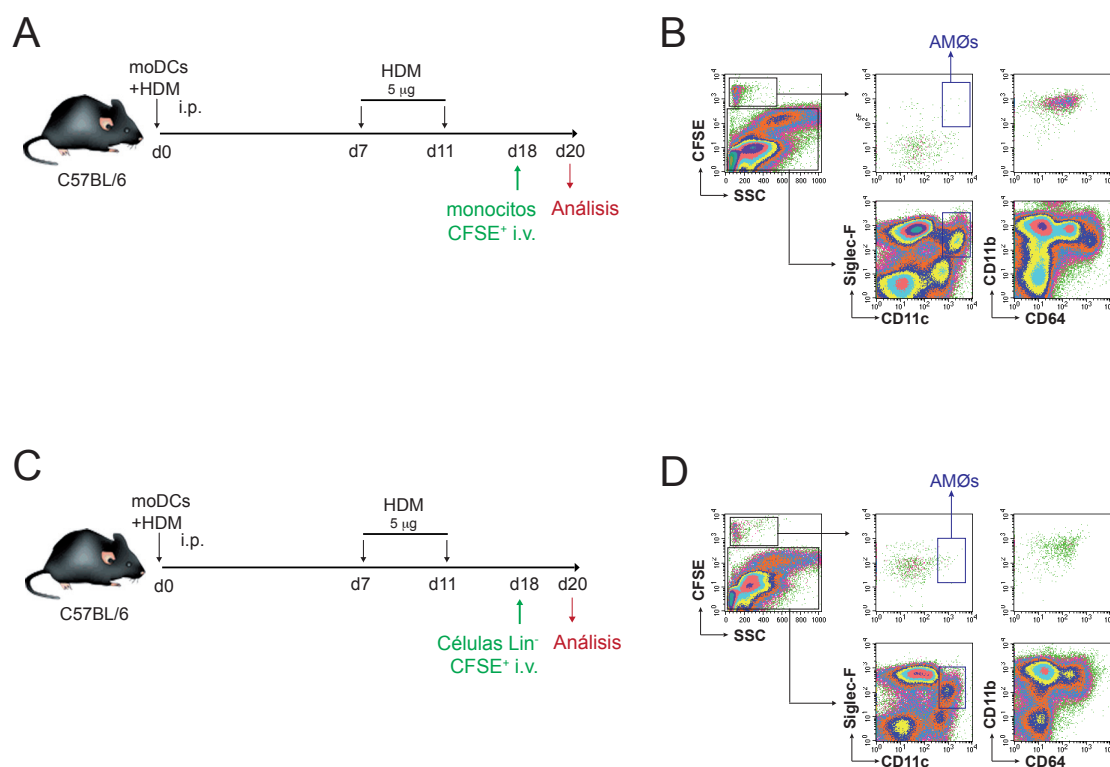


Figura 29. Análisis de la contribución de monocitos y de precursores tempranos de médula a la generación de AMØs durante un protocolo de alergia fuerte. A. Se inyectaron i.v. a día 18 monocitos marcados con CFSE y se analizó su contribución a la población de AMØs a día 20. **B.** Fenotipo de los monocitos CFSE⁺ a día 20 del proceso alérgico. **C.** Se aislaron precursores de médula ósea en base a una selección negativa para MHC-II, CD90 y Ly-6G, se marcaron con CFSE y se inyectaron i.v. a día 18 para analizar su contribución a los AMØs a día 20. **D.** Fenotipo de los precursores CFSE⁺ a día 20 del proceso alérgico.

Ya que una posibilidad durante los experimentos de transferencia es que no se hayan realizado en el momento adecuado, con el fin de valorar la posible implicación de los monocitos en la regeneración de los AMØs, se analizaron ratones CCR2^{-/-} durante un protocolo de alergia fuerte. Se analizó el pulmón a día 7, día 12 y día 20 para observar la pérdida y recuperación de la población de AMØs (Figura 30, A). Los ratones CCR2^{-/-}, presentaban una cinética de regeneración retardada respecto a los ratones C57BL/6, lo que sugiere que los monocitos o algún otro precursor CCR2 dependiente pueden contribuir a la población de AMØs (Figura 30, B).

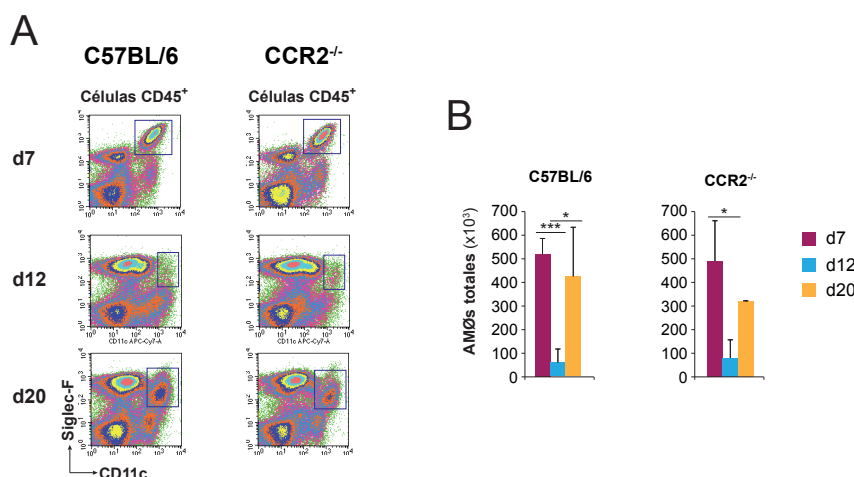


Figura 30. Análisis de la regeneración de los AMØs en ratones CCR2^{-/-}. **A.** Análisis de los AMØs en el pulmón de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-} durante un protocolo de alergia fuerte. **B.** Cuantificación de los AMØs en el pulmón de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-} a los tiempos indicados.

Cinética de las poblaciones alveolares durante la infección por *Klebsiella pneumoniae*

Nuestros datos, así como resultados de otros grupos, sugieren que la reacción inflamatoria inducida durante la respuesta alérgica, y que conlleva la invasión del espacio alveolar por un alto número de eosinófilos, contribuiría a la apoptosis de los AMØs. En este sentido, quisimos abordar si tiene lugar el mismo proceso de pérdida de AMØs durante un modelo de infección.

El patógeno elegido para el estudio de la cinética de los AMØs fue *Klebsiella pneumoniae* por su relevancia clínica, ya que se trata de una bacteria gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae* causante de numerosas infecciones oportunistas en pacientes de hospital, inmunodeprimidos o neonatos. La infección se realizó de manera i.t. y el análisis se llevó a cabo los días 1, 2 y 3 posteriores a la inoculación del patógeno (Figura 31, A).

En primer lugar, se analizaron las poblaciones de monocitos y DCs (Figura 31, B). A partir de día 2, las cDCs quedaron enmascaradas por el incremento sufrido por las moDCs, por lo que fue imposible identificar las cDCs CD11b⁺, al no disponer de ningún otro

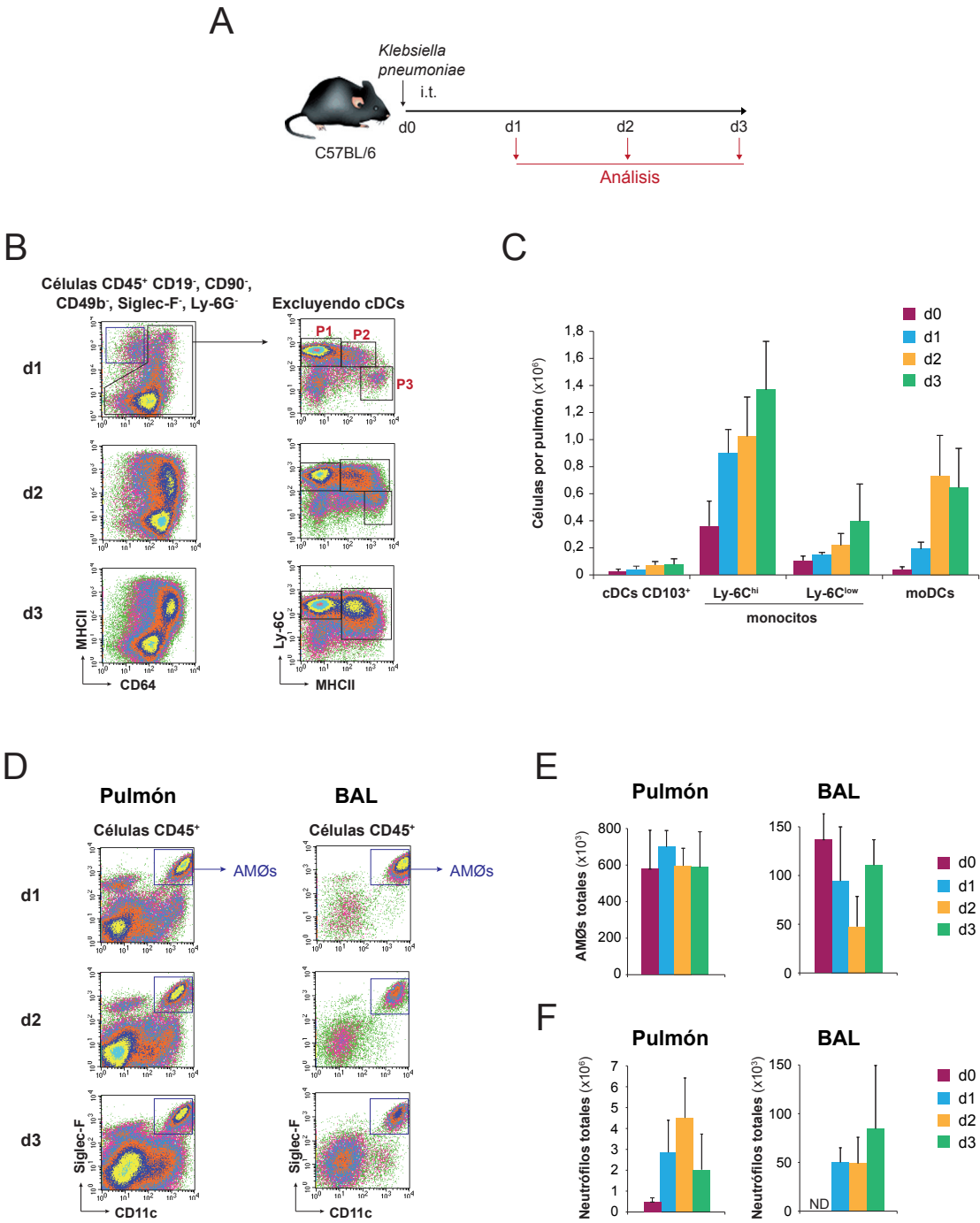


Figura 31. Análisis de las poblaciones pulmonares durante una infección aguda contra *Klebsiella pneumoniae*. **A.** A día 0, se inyectaron 500 cfus de *Klebsiella pneumoniae* i.t y se analizaron los ratones los días 1, 2 y 3. **B.** Proceso de diferenciación de los monocitos Ly-6C^{hi} durante la infección por *Klebsiella pneumoniae*. **C.** Cuantificación de cDCs, monocitos, moDCs y iMØs pulmonares en ratones C57BL/6 durante la infección por *Klebsiella pneumoniae*. **D.** Análisis de los AMØs en el pulmón y en el BAL durante la infección por *Klebsiella pneumoniae*. **E.** Cuantificación de los AMØs en el pulmón y en el BAL a los tiempos indicados tras la infección. **F.** Cuantificación de los neutrófilos en el pulmón y en el BAL a los tiempos indicados tras la infección

marcador diferencial, y sólo se cuantificaron las cDCs CD103⁺ (Figura 31, B). Tal y como está descrito para otros modelos inflamatorios (Herold et al., 2011), los monocitos quedaban bloqueados durante su diferenciación y las moDCs que se generaron correspondían al estado inmaduro de P2 (Figura 31, B). Los números de células confirmaron un aumento progresivo en los monocitos Ly-6C^{hi} y en las moDCs, que no se reflejó en las cDCs CD103⁺, ni en los monocitos Ly-6C^{low} (Figura 31, C). La infección por *Klebsiella pneumoniae*, por tanto, conlleva un fuerte reclutamiento de monocitos que se diferencian localmente a DCs inflamatorias.

Los AMØs en el pulmón y en el BAL se identificaron mediante la expresión de CD11c y Siglec-F (Figura 31, D). Los números de AMØs no sufrieron variaciones ni en el pulmón ni en el BAL respecto a los datos de un ratón no infectado (Figura 31, E). Se cuantificaron también los números de neutrófilos en el pulmón y en el BAL, que aumentaron considerablemente respecto a un ratón no infectado (Figura 31, F). En este modelo de infección por lo tanto, aunque se genere un entorno inflamatorio fuerte, tal y como muestran los números de neutrófilos, los AMØs no desaparecían a los tiempos estudiados.

DISCUSIÓN

Papel de IL-4 en el acondicionamiento de las moDCs para la inducción de respuestas Th2

Nuestros datos muestran que la IL-4 tiene la habilidad de modular las DCs para la inducción de respuestas Th2, actuando durante su diferenciación. Resultados previos obtenidos en el laboratorio indicaron que la presencia de IL-4 durante la diferenciación *in vitro* de monocitos a moDCs influía en las propiedades funcionales de las IL4-moDCs resultantes (Lopez-Bravo et al., 2013). Por un lado, se bloqueaba su potencial para producir citoquinas inflamatorias y polarizantes Th1 en respuesta a ligandos de TLR y, además, IL-4 inducía la expresión de genes implicados en el reclutamiento de células con un importante papel en las respuestas Th2 (eosinófilos, basófilos y monocitos). A la luz de estos resultados previos, los datos presentados en este trabajo han confirmado, en un modelo *in vivo*, que IL-4 licencia las IL4-moDCs para la inducción de respuestas Th2 durante una reacción alérgica frente a HDM.

Estos hallazgos sugieren que, tanto durante infecciones causadas por helmintos como durante reacciones alérgicas, se generan nuevas DCs, derivadas o no de monocitos, que pueden ser acondicionadas para la inducción de respuestas Th2 por IL-4 presente durante su proceso de diferenciación. Para explorar esta hipótesis, originalmente nos propusimos llevar a cabo experimentos de inducción de alergia frente a HDM, en ratones IL-4R^{-/-}. Sin embargo, poco tiempo después del inicio de esta tesis doctoral, el grupo del Dr. Brombacher publicó que el receptor IL-4R no desempeñaba un papel importante en la función de los MØs pulmonares durante procesos de alergia (Nieuwenhuizen et al., 2012). A raíz de este artículo, realizamos experimentos de inducción de alergia frente a HDM en ratones control y ratones IL-4R^{-/-} que revelaron que, contrariamente a lo esperado, la deficiencia en IL-4R se traducía en una exacerbación de la respuesta alérgica (Minguito y Ardavín, datos no publicados). A pesar de que estos resultados no excluyen que IL-4 tenga un papel importante en la determinación de la especialización funcional de los monocitos y/o de las células derivadas de ellos durante la inducción de reacciones alérgicas, para abordar este punto sería necesario generar una línea de ratones deficientes para IL-4R selectivamente en monocitos inflamatorios.

Por otro lado, la identidad de las DCs responsables de la inducción de células Th2 específicas durante las respuestas alérgicas en condiciones fisiológicas, aún es objeto de controversia. Se ha propuesto que las cDCs CD103⁺ son las responsables de la inducción de una respuesta alérgica frente a HDM (Nakano et al., 2012b). Sin embargo, también se ha sugerido que tanto las cDCs CD11b⁺ como las moDCs están involucradas en la inducción de respuestas alérgicas frente a altas dosis de HDM, aunque sólo las cDCs CD11b⁺ eran eficientes frente a dosis fisiológicas de HDM (Plantinga et al., 2013). Estos resultados se han relacionado con la menor capacidad de las moDCs para migrar al M-LN al expresar niveles menores de CCR7 (Nakano et al., 2012a). Datos más recientes han puesto de manifiesto la implicación de las cDCs CD11b⁺ dependientes de IRF4 en la inducción de la respuesta frente a la infección por el helminto *N. brasiliensis* (Gao et al., 2013). En este sentido, se ha demostrado que GM-CSF tiene un papel fundamental en el acondicionamiento de estas cDCs CD11b⁺ dependientes de IRF4 durante una respuesta alérgica frente al ácaro *Blomia*

tropicalis (Zhou et al., 2014). Sin embargo, los últimos datos publicados sugieren que la población de cDCs IRF4-dependiente era heterogénea, y que las células encargadas de iniciar las respuestas Th2 eran las correspondientes a un subtipo de cDCs CD11b⁺ dependientes de *Klf4* (factor de transcripción Kruppel-like factor 4) (Tussiwand et al., 2015). De este modo, *klf4* dirigiría el programa transcripcional necesario para la inmunidad Th2 tanto en infecciones frente a helmintos, como durante las reacciones alérgicas.

Definición de las poblaciones monocítico-DC-macrofágicas pulmonares

Una parte fundamental de este trabajo se ha centrado en la definición de las poblaciones leucocitarias pulmonares en reposo, así como en las variaciones que sufren durante una respuesta alérgica frente a HDM.

Análisis de las moDCs en los pulmones de ratones en reposo

A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, como piel o intestino, donde los monocitos que se reclutan desde la sangre se diferencian a DCs y MØs (Tamoutounour et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012), se ha propuesto que los monocitos se reclutan continuamente al pulmón y mantienen un estado indiferenciado (Jakubzick et al., 2013). Sin embargo, nuestros datos han mostrado que en reposo existe un pequeño número de moDCs en los pulmones no alérgicos, de acuerdo con estudios recientes (Plantinga et al., 2013). La existencia de moDCs en reposo podría deberse a un estado de activación basal de las poblaciones pulmonares que implique el reclutamiento y la diferenciación de monocitos Ly-6C^{hi}, debido a las características microbiológicas del animalario. Para descartar esta hipótesis se realizaron experimentos en ratones libres de patógenos recibidos el mismo día de la casa comercial. Nuestros resultados indicaron que en los pulmones de ratones sin estimular existían monocitos que mantenían su estado de indiferenciación y monocitos que se diferenciaban dando lugar a moDCs. En este sentido, datos recientes han puesto de manifiesto que en la extensa red capilar que irriga el parénquima pulmonar existen monocitos localizados en los compartimentos intra y extra-vascular (Rodero et al., 2015). Estos monocitos se quedan parcialmente retenidos en los capilares pulmonares llevando a cabo funciones de vigilancia inmunológica. Una posible hipótesis es que se mantengan en estado indiferenciado mientras permanezcan en esta localización, pudiéndose especular que una vez que penetran en el parénquima e interaccionan con la microbiota pulmonar, podrían generarse moDCs incluso durante situaciones no inflamatorias. Tal y como se ha descrito para el caso de la piel o el intestino, que en ratones libres de patógenos, han observado una reducción en el número de células derivadas de monocitos (Bain et al., 2014; Tamoutounour et al., 2013).

Análisis de los iMØs en los pulmones de ratones en reposo

Existe una cierta controversia en lo que respecta a la caracterización fenotípica de los iMØs. Nuestros datos indican que se trata de una población MHCII^{int}, Ly-6C^{int}, CD64^{hi},

CD11b^{hi}, CD11c^{int} y CCR2⁻. En un estudio en el que analizaron las poblaciones pulmonares en reposo (Misharin et al., 2013), denominaron iMØs a una población que corresponde a nuestras moDCs. También se ha utilizado la molécula MerTK para diferenciar las poblaciones de moDCs y iMØs (Jakubzick et al., 2013), siendo las moDCs MerTK⁻ y los iMØs MerTK⁺. Sin embargo, nuestros experimentos no confirmaron esta expresión diferencial, siendo ambas poblaciones positivas para MerTK. Por lo tanto, no pudimos utilizar este marcador para este fin.

Respecto a su origen, se ha propuesto que la población de iMØs contiene células derivadas tanto de MØs del saco vitelino, como de monocitos adultos de médula ósea (Schulz et al., 2012). Sin embargo, la contribución de células adultas de médula ósea es controvertida. Mientras que existen datos que indicaron que existe un cierto intercambio durante experimentos de parabiosis (Scott et al., 2014), otros estudios, en los que también se utilizó esta técnica, sugirieron que esta población no se intercambiaba, y por lo tanto, que no se regeneraba a partir de un precursor de sangre (Jakubzick et al., 2013). Nuestros datos indicaron que el número de iMØs, al contrario que el de moDCs, no estaba reducido en ratones CCR2^{-/-}, lo que apoya que no derivan de monocitos adultos. El hecho de que en algunos estudios se haya propuesto un origen monocítico parcial puede deberse a diferencias entre distintos animalarios, sugiriendo que en animalarios con cierta contaminación de patógenos los monocitos se recluten activamente al pulmón. Otra posibilidad puede ser que exista una contaminación de moDCs en la región analizada, ya que si los marcajes no son suficientemente precisos, es posible que la diferencia en la expresión de MHCII entre las dos poblaciones no sea claramente excluyente. Por otro lado, durante una respuesta alérgica frente a HDM el número de moDCs aumentaba considerablemente, mientras que los iMØs no sufrían variaciones. Por lo tanto, atendiendo a su origen y a su distinta regulación durante un proceso alérgico, podemos sugerir que moDCs y iMØs son poblaciones independientes. Debido a la dificultad que existe para identificar esta población, la relevancia fisiológica de los iMØs permanece sin resolverse. Utilizando un modelo de alergia frente a bajas cantidades de LPS, se ha propuesto los iMØs regulan negativamente la función de las DCs pulmonares durante una reacción alérgica (Bedoret et al., 2009). Sin embargo, en este estudio los iMØs se caracterizaron como células F4/80⁺ CD11c⁻. Este fenotipo no está de acuerdo con nuestros datos, ni con los de otros grupos (Jakubzick et al., 2013; Misharin et al., 2013; Scott et al., 2014), por lo que se necesitaran estudios donde aborden su función fisiológica que impliquen un fenotipaje más exhaustivo.

Diferenciación de monocitos Ly-6C^{hi} en moDCs

Nuestros datos han puesto de manifiesto que durante una respuesta alérgica frente a HDM se reclutan monocitos al pulmón. Además, el número de moDCs en el pulmón aumentaba entre día 7 y día 10 del proceso alérgico inducido por HDM. Estos datos sugieren que durante una respuesta alérgica inducida por HDM, tiene lugar una diferenciación *in situ* de monocitos a moDCs. Se ha descrito que en situaciones de inflamación los monocitos Ly-6C^{hi} circulantes pueden extravasarse a los tejidos y diferenciarse en el sitio de infección en células que poseen características fenotípicas y funcionales de las DCs (Leon and Ardavin,

2008). Este proceso de diferenciación está notablemente disminuido en ratones CCR2^{-/-}, confirmando el origen monocítico de la nueva población de moDCs. La diferenciación ocurre de manera secuencial, en primer lugar los monocitos reclutados adquieren MHCII y posteriormente pierden Ly-6C generando una moDC madura. Este proceso de diferenciación ocurre a través de tres estadios denominados P1, P2 y P3.

En este sentido, en un modelo de piel e intestino se ha propuesto que los monocitos se diferencian localmente a moDCs a través de un estadio intermedio, denominado P2 (Tamoutounour et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012). En el estudio realizado en el intestino se inyectaron monocitos Ly-6C^{hi} y se trazó su progenie a las 12h y las 72h, confirmando que en primer lugar se genera P2 y a continuación P3, correspondiente a los macrófagos intestinales (Tamoutounour et al., 2012). En el estudio realizado en piel, se utilizó un modelo en el que se eliminaban las células CD11b⁺ por medio de la administración de la toxina diftérica. Esto les permitió establecer una relación temporal entre las poblaciones denominadas P1, P2 y P3, ya que 5 h más tarde de la administración de la toxina no existía ninguna de las tres poblaciones, 12 h más tarde aparecía P1, a los 7 días detectaban P2 y finalmente, a los 20 días aparecía P3 (Tamoutounour et al., 2013).

Impacto de la deficiencia de monocitos en la regulación de la respuesta alérgica frente a HDM

Los resultados derivados del análisis de ratones CCR2^{-/-} indicaron que estos ratones tenían disminuido el número de monocitos y moDCs en el pulmón durante una reacción alérgica. Sin embargo, no tenían afectado el número de monocitos Ly-6C^{low} ni de iMØs. Por otro lado, también observamos una reducción de alrededor de un 50% en el número de cDCs CD11b⁺ y de un 20% en el número de cDCs CD103⁺ a lo largo del proceso alérgico. El análisis de la expresión de CCR2 en las cDCs indicó que existe un alto porcentaje de cDCs CD11b⁺ y CD103⁺ que son CCR2⁺. Un estudio reciente en el que utilizan un ratón reporter CCR2-RFP mostró que no únicamente los monocitos expresaban CCR2, sino que existían también cDCs, pDCs, NKs y neutrófilos CCR2⁺ en la médula ósea, sangre, bazo y LNs (Fujimura et al., 2015). Además sugirieron que CCR2 jugaba un papel principal en la movilización de estas poblaciones desde la médula. De este modo, la reducción que observamos en el número de cDCs pulmonares puede deberse a la implicación de CCR2 en la migración de sus precursores desde la médula ósea.

Por otro lado, la reducción en el número de monocitos y moDCs en los ratones CCR2^{-/-} durante la respuesta alérgica frente a HDM conllevaba un mayor número de eosinófilos en el pulmón y en el BAL. El análisis de la respuesta alérgica en los M-LNs reveló que los ratones CCR2^{-/-} eran más alérgicos. Del mismo modo, el análisis de la respuesta alérgica en los ratones IFNAR^{-/-}, los cuales también tenían reducido su número de monocitos Ly-6C^{hi}, reveló que estos también tenían mayor infiltración de eosinófilos en el pulmón y producían mayor cantidad de citoquinas Th2 en los M-LNs. Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos en los que se ha utilizado un modelo de OVA (Kim et al., 2001) y de *Aspergillus fumigatus* (Blease et al., 2000) en ratones CCR2^{-/-}. En ellos concluyeron que los ratones deficientes desarrollaban una mayor respuesta alérgica,

en términos de reclutamiento de eosinófilos y concentración de citoquinas Th2 en el BAL, en comparación con los ratones control C57BL/6. Del mismo modo, más recientemente, en un modelo de alergia cutánea, se ha descrito que los monocitos Ly-6C^{high} reclutados a la piel, adquirirían un fenotipo M2 (activados alternativamente) en respuesta a IL-4 producida por los basófilos. Los MØs M2 generados expresaban PD-L2 (Programme Death Ligand 2) y producían moléculas destinadas a la remodelación de tejido, comportándose como reguladores negativos de la respuesta alérgica (Egawa et al., 2013). Sin embargo, otros estudios en los que han abordado el papel de los monocitos frente a una respuesta inducida por el alérgeno de la cucaracha (Campbell et al., 1999) o durante una respuesta Th2 frente a *Schistosoma mansoni* (Warmington et al., 1999) han propuesto que los monocitos tienen un papel de regulación positiva. Por otra parte, utilizando un modelo de alergia frente a HDM similar al nuestro, se ha propuesto que los AMØs desempeñaban un papel de regulación negativa frente a la alergia, mientras que los monocitos la promovían (Zaslona et al., 2014). Para ello, eliminaron selectivamente los AMØs o los monocitos inyectando liposomas de clodronato i.t. o i.v. respectivamente y observaron que el grado de alergia era mayor cuando introducían los liposomas i.t. y menor cuando eliminaban los monocitos por la vía i.v. Sin embargo, los liposomas de clodronato generan una fuerte inflamación y por lo tanto, el papel de los monocitos como reguladores negativos podría estar revertido por el entorno inflamatorio.

Cinética de las poblaciones alveolares

Apoptosis de AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM

Durante los últimos años han sido muchos los estudios que han tratado de abordar el origen de los MØs residentes. Actualmente se acepta que en condiciones homeostáticas la mayoría, incluyendo los AMØs, se generan a partir de precursores embrionarios (Schulz et al., 2012) y se mantienen por proliferación independientemente de los monocitos adultos (Hashimoto et al., 2013). Existen pocos datos destinados a abordar su regeneración tras un evento inflamatorio. Durante una infección parasitaria en la cavidad peritoneal, se ha descrito que tasa la proliferativa de los MØs peritoneales aumentaba de un 1% a un 9% (Jenkins et al., 2011). Sin embargo, la identificación de las señales locales que dirigen la proliferación y supervivencia de los MØs durante situaciones inflamatorias en cada uno de los tejidos sigue siendo objeto de estudio.

El análisis del perfil de FSC-SSC de los AMØs durante una reacción alérgica indicó que los AMØs sufrían un proceso de apoptosis, lo que se confirmó mediante marcaje con anexina. Estos datos sugerían que durante una reacción alérgica más fuerte, los AMØs desaparecerían por completo. Utilizando un protocolo de inducción de alergia frente a HDM por medio de la inyección de IL4-moDCs, los AMØs desaparecían a día 12 y reaparecían entre día 20 y día 28, durante lo que hemos llamado fase de regeneración. Además, hemos observado que la desaparición de los AMØs coincidía con el pico máximo de reclutamiento de eosinófilos al pulmón. Estos datos sugieren que durante una reacción alérgica severa frente a HDM, en la que existe una fuerte eosinofilia, tiene lugar la apoptosis y destrucción

masiva de los AMØs. Datos preliminares en los que hemos analizado el surfactante presente en el BAL, sugieren que el hecho de que la población de AMØs desaparezca, puede afectar a la homeostasis pulmonar y a la correcta resolución de la inflamación. Existen pocos trabajos destinados a abordar la apoptosis de los AMØs. Durante una respuesta alérgica, trabajos realizados en pacientes indican que los AMØs de los pacientes asmáticos sufrían un mayor grado de apoptosis (Fitzpatrick et al., 2008; Huynh et al., 2005). También se ha descrito que los AMØs sufren apoptosis durante la exposición a contaminantes como el humo del tabaco (Aoshiba et al., 2001) o las partículas de diesel (Hiura et al., 1999). Y por último, se ha descrito un mecanismo de defensa contra infecciones bacterianas que también implica la muerte de los AMØs (Aberdein et al., 2013; Dockrell et al., 2003; Marriott et al., 2006). En los estudios realizados en pacientes, tanto adultos como niños, concluyeron que el porcentaje de AMØs apoptóticos era mayor en el BAL de pacientes asmáticos que en el de los pacientes sanos, y que este porcentaje aumentaba cuanto mayor era el grado de alergia (Fitzpatrick et al., 2008; Huynh et al., 2005). Sin embargo, no existen datos sobre la regeneración de los AMØs en pacientes que han sufrido un proceso de alergia. Respecto a los estudios de los AMØs durante una inflamación causada por contaminantes como el humo del tabaco (Aoshiba et al., 2001) o las partículas de diesel (Hiura et al., 1999), se ha propuesto que la apoptosis estaba relacionada con el estrés oxidativo y que los radicales libres que se generaban en el pulmón inducían la apoptosis, ya que el tratamiento con anti-oxidantes disminuía la apoptosis de los AMØs. En el caso de una infección bacteriana, los AMØs son la primera línea de protección pulmonar al fagocitar y eliminar las bacterias que invaden el espacio alveolar. Sin embargo, cuando el sistema de eliminación se ve desbordado, se ha propuesto que los AMØs entran en apoptosis como mecanismo de defensa (Aberdein et al., 2013; Dockrell et al., 2003; Marriott et al., 2006). Los AMØs apoptóticos eran posteriormente fagocitados por otros AMØs para contribuir a la resolución de la inflamación. Nuestros datos sugieren que el mecanismo de desaparición de los AMØs durante la alergia inducida por HDM puede estar causado por los productos liberados por los eosinófilos en el pulmón.

Papel de los eosinófilos durante la respuesta alérgica frente a HDM

En línea con lo descrito anteriormente, diferentes modelos experimentales han puesto de manifiesto que los eosinófilos pueden estar implicados en el daño tisular. Los gránulos de los eosinófilos activados contienen proteínas tóxicas altamente inflamatorias como la MBP (Major Basic protein), la EPO (Eosinophil Peroxidase) o la ECP (Eosinophil Cationic Protein). Está descrito que la MBP es capaz de inducir daño en los parásitos durante infecciones por helmintos (Gleich et al., 1979). Sin embargo, también se ha descrito que la MBP daña el epitelio respiratorio al desestabilizar las membranas plasmáticas y aumentar su permeabilidad (Rothenberg, 1998), por lo que puede ser tóxica a altas concentraciones. La EPO por su parte, en presencia de peróxido de hidrógeno y bromuro, cataliza la producción de HOBr, el cual tiene un efecto tóxico sobre las células epiteliales de la vías aéreas (Brottman et al., 1996). Por último, se ha descrito que la ECP genera poros en células inmunes efectoras (Young et al., 1986). En este sentido, éstas y otras proteínas podrían ser tóxicas también para los AMØs y provocar su muerte, sugiriendo que

los eosinófilos pulmonares podrían estar directamente implicados en la apoptosis de los AMØs durante una reacción alérgica.

Los eosinófilos se han asociado generalmente con respuestas Th2, incluyendo infecciones por parásitos y reacciones alérgicas, aunque también están presentes en los tejidos en homeostasis (Rothenberg and Hogan, 2006). En una situación de reposo su vida media es de 2-3 días, aunque ésta aumenta hasta varias semanas cuando se encuentran en un tejido inflamado (Geering et al., 2013), gracias a la presencia de IL-5, la cual inhibe la apoptosis y aumenta la supervivencia de los eosinófilos (Kouro and Takatsu, 2009). Nuestros datos indican que durante una reacción alérgica frente a HDM, el número de eosinófilos en el pulmón aumenta considerablemente. Este aumento puede ser debido a una mayor generación de eosinófilos en la médula ósea y reclutamiento al pulmón y/o a una mayor supervivencia de los eosinófilos en los tejidos.

Los eosinófilos se caracterizan por la expresión de Siglec-F (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F*). Siglec-F es una proteína de unión a glicanos que tras la unión a su ligando induce apoptosis en los eosinófilos. Los AMØs también expresan altos niveles de Siglec-F; sin embargo, no se relaciona con la inducción de apoptosis en esta población (Feng and Mao, 2012). Los ligandos para Siglec-F se encuentran en el epitelio bronquial; en concreto se han identificado como ligandos endógenos para Siglec-F las mucinas Muc4 y Muc5b (Kiwamoto et al., 2014). Se ha propuesto que la expresión de Siglec-F permite diferenciar el estado de activación de los eosinófilos. En este sentido, los eosinófilos no activados son Siglec-F^{low}, mientras que los eosinófilos Siglec-F^{hi} se corresponden con eosinófilos activados. En un modelo de respuesta Th2 frente a infección por *N. brasiliensis*, se ha propuesto que los eosinófilos generados *de novo* en la médula ósea se incorporaban a la población Siglec-F^{low} de eosinófilos pulmonares, mientras que los eosinófilos Siglec-F^{hi} experimentaban un incremento de la vida media debido a las condiciones inflamatorias del tejido (Ohnmacht et al., 2007). Recientemente se ha descrito el mismo proceso de generación y mantenimiento de eosinófilos en un modelo de colitis (Griseri et al., 2015). El análisis de los eosinófilos a los distintos tiempos durante la respuesta alérgica frente a HDM indicó que existían dos poblaciones claramente diferenciadas en base a los niveles de expresión de Siglec-F. A día 7, los eosinófilos tenían un nivel de Siglec-F basal en el pulmón, por lo que correspondía a la población descrita como Siglec-F^{low}. A medida que la reacción alérgica avanzaba, aparecía una población nueva caracterizada por una mayor expresión de Siglec-F, correspondiente a los eosinófilos Siglec-F^{hi}. El análisis de los eosinófilos en el BAL mostró que en esta localización, únicamente existían eosinófilos Siglec-F^{hi}. Para confirmar que únicamente los eosinófilos Siglec-F^{hi} entraban en el espacio alveolar, se realizaron experimentos en los que utilizamos α -CD45 para marcar las células presentes en el lavado bronqueoalveolar. Los resultados indicaron que a día 7, los eosinófilos Siglec-F^{low} se localizaban en el parénquima pulmonar. A día 12, esta población continuaba en dicha localización mientras que alrededor del 50% de los eosinófilos Siglec-F^{hi} se encontraban en el espacio alveolar. De acuerdo con estos datos, podemos hipotetizar que durante una reacción alérgica frente a HDM los eosinófilos Siglec-F^{low} se reclutarían al pulmón inflamado y una vez en el tejido se activarían sobreexpresando Siglec-F (Rose et

al., 2010). Finalmente, los eosinófilos Siglec-F^{hi} migrarán al espacio alveolar, donde serán eliminados.

Regeneración de AMØs durante la respuesta alérgica frente a HDM

Nuestros resultados indican que durante un protocolo de alergia fuerte la desaparición de los AMØs es temporal y que estos se recuperan entre día 20 y día 28. Sin embargo, a día 20 la nueva población de AMØs expresa niveles menores de Siglec-F y niveles mayores de CD11b. A día 28, el número de AMØs era muy similar al que existía a día 7 y el nivel de expresión de Siglec-F aumentó respecto a día 20. La experimentación destinada a determinar qué precursores son responsables de la regeneración de los AMØs está actualmente en desarrollo en el laboratorio del Dr Carlos Ardavin, ya que los experimentos preliminares, realizados en el marco de esta tesis doctoral, no han permitido resolver por el momento esta cuestión.

La regeneración de los AMØs ha sido estudiada utilizando distintos modelos experimentales en los cuales los AMØs fueron eliminados mediante irradiación, o insulto genotóxico (ratones DTR) (Hashimoto et al., 2013; Landsman and Jung, 2007; Lee et al., 2014; Liang et al., 2012), y se regeneraban por reclutamiento de monocitos. Por otro lado, se ha descrito que tras infección por *Toxoplasma* (Goldszmid et al., 2012) o por el virus de la gripe (Hashimoto et al., 2013) también existía un importante descenso en el número de AMØs. En el caso del modelo del virus de la gripe, en una primera fase, la regeneración de los AMØs tras la infección viral se llevaba a cabo por un precursor de médula ósea no definido, y eran progresivamente repuestos por los AMØs originales capaces de proliferar. El número de AMØs previo a la infección se recuperó después de cuatro semanas.

Por otro lado, se ha descrito que tras infección por *Streptococcus pneumoniae* (Kirby et al., 2006) o inoculación de LPS (Herold et al., 2011) se produce el reclutamiento de una nueva población de AMØs derivados de monocitos, que expresaban niveles más altos de CD11b que los AMØs pre-existentes. En este sentido, nuestros datos indican que los nuevos AMØs generados durante la reacción alérgica expresan niveles mayores de CD11b y menores de Siglec-F en comparación con los AMØs a día 7. Es interesante señalar que este fenotipo CD11b^{hi} SiglecF^{low} de los nuevos AMØs corresponde al fenotipo descrito para la población de pre-AMØs que se generan a partir de monocitos fetales durante el desarrollo embrionario (Guilliams et al., 2013). El grupo del Dr M. Kopf ha publicado recientemente que estos pre-AMØs son CD11c^{hi}, CD11b^{hi}, Siglec-F^{low}, Ly-6C^{low} y se convierten en AMØs maduros tras la activación de PPAR-γ por medio del GM-SCF producido por las células epiteliales (Schneider et al., 2014). Experimentos en curso en nuestro laboratorio están destinados a determinar si los pre-AMØs se localizan en el parénquima pulmonar o en el espacio alveolar. En este sentido, se ha propuesto que los pre-AMØs se generan previamente al nacimiento en el parénquima pulmonar, y salen al espacio alveolar una vez que se convierten en AMØs maduros (Guilliams et al., 2013; Schneider et al., 2014).

Por último, es importante resaltar que, durante la fase de regeneración, algunos AMØs generan células gigantes multinucleadas (MGCs – Multinucleated Giant Cells). La existencia de estas células generalmente se ha asociado al desarrollo de granulomas

durante infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Silva Miranda et al., 2012), aunque también se han descrito tras daño pulmonar inducido por sílice o asbesto (Prieditis and Adamson, 1996). Se ha propuesto que los procesos de inflamación crónica en el pulmón facilitan la formación de MGCs que resultan de la fusión post-mitótica de AMØs, ligado a la proliferación de estos y dependiente de citoquinas Th2 como IL-4 e IL-13 (Anderson et al., 1999). De la misma forma, durante una respuesta alérgica crónica, los AMØs se regenerarían en un entorno Th2 con altas concentraciones de IL-4 e IL-13, favoreciendo su fusión y la aparición de MGCs.

Cinética de las poblaciones alveolares durante la respuesta frente a *K. pneumoniae*

Nuestros datos sugieren que tras una infección por *Klebsiella pneumoniae* aumenta el número de monocitos Ly-6C^{hi} y de moDCs en el pulmón. Sin embargo, el proceso de diferenciación de monocitos a moDCs está bloqueado en el estado inmaduro P2. Tal y como se ha descrito durante una infección frente al virus de la gripe (Aldridge et al., 2009), la función principal de esta población MHCII^{low} Ly-6C^{hi} será la producción de INOS y TNF. Existen estudios previos que sugieren que los monocitos Ly-6C^{hi} pulmonares aumentaban tras la infección con *Klebsiella pneumoniae* (Chen et al., 2013) y que eran esenciales durante la respuesta utilizando ratones CCR2^{-/-} (Xiong et al., 2015). Además, se ha propuesto que la expresión de MHCII por parte de las moDCs tras la infección era muy inferior a la que existía en reposo (Hackstein et al., 2013), y por lo tanto, sugiriendo su bloqueo en P2.

A diferencia de los datos derivados de modelos de infección por *Toxoplasma* o por el virus de la gripe, en los que se producía una fuerte disminución de los AMØs, nuestros datos demuestran que tras la infección con *K. pneumoniae* no existía muerte ni reclutamiento de AMØs al pulmón. Esto podría deberse a que *K. pneumoniae* es una bacteria extracelular y no necesita replicarse dentro de los AMØs, por lo que estos no estarían directamente dañados por la presencia de la bacteria. Aún así, el entorno en el que se encontraban los AMØs durante la infección era altamente inflamatorio, ya que existía una fuerte infiltración de neutrófilos, sugiriendo que durante una respuesta alérgica frente a HDM se generaba de forma específica algún mediador causante de la muerte de los AMØs.

CONCLUSIONS

1. IL-4 tiene el potencial de condicionar las moDCs para la inducción de respuestas Th2 durante un proceso alérgico frente a HDM.
2. Las moDCs, previamente descritas en el pulmón durante la alergia inducida por HDM, existen también en un pulmón en reposo.
3. Los iMØs son CD64⁺ MHCII^{int} Ly-6C^{int} y están presentes tanto en pulmones en reposo, como durante una reacción alérgica frente a HDM.
4. Los monocitos Ly-6C^{high} se reclutan al pulmón durante una reacción alérgica de forma dependiente de CCR2 y se diferencian localmente a moDCs a través de un estadio inmaduro MHCII^{int} Ly-6C^{int} denominado P2.
5. Los ratones CCR2^{-/-} tienen loqueado el reclutamiento de monocitos inflamatorios Ly-6C^{hi} al pulmón durante la alergia inducida por HDM, así como la diferenciación de las moDCs inflamatorias; sin embargo, no tienen defectos en el número de monocitos Ly6C^{low} ni de iMØs.
6. Los ratones CCR2^{-/-} desarrollan una mayor reacción alérgica frente a HDM caracterizada tanto por una mayor infiltración de eosinófilos, como por una mayor producción de citoquinas Th2 en los M-LNs.
7. Los ratones IFNAR^{-/-} tienen un defecto en el número de monocitos Ly-6C^{hi}, asimismo tienen reducido el número de moDCs tanto en reposo como durante una respuesta alérgica frente a HDM, y por lo tanto, también desarrollan una mayor alergia frente a HDM que los ratones C57BL/6.
8. Durante una reacción alérgica, los AMØs sufren un proceso de apoptosis que se traduce en una desaparición masiva de esta población durante reacciones alérgicas frente a HDM, y se correlaciona con el máximo desarrollo de la eosinofilia alveolar.
9. Los AMØs se regeneran a través de una población de AMØs CD11b^{hi} Siglec-F^{low}, a medida que los niveles de alergia disminuyen.
10. Durante una infección frente a *Klebsiella pneumoniae*, se reclutan monocitos Ly-6C^{hi} al pulmón que regulan la expresión de MHCII pero no completan el proceso de diferenciación a moDCs. Además, existe un fuerte reclutamiento de neutrófilos al pulmón, aunque los AMØs no desaparecen ni muestran signos de degeneración.

BIBLIOGRAFÍA

Aberdein, J.D., Cole, J., Bewley, M.A., Marriott, H.M., and Dockrell, D.H. (2013). Alveolar macrophages in pulmonary host defence the unrecognized role of apoptosis as a mechanism of intracellular bacterial killing. *Clin Exp Immunol* 174, 193-202.

Abernethy, N.J., Chin, W., Hay, J.B., Rodela, H., Oreopoulos, D., and Johnston, M.G. (1991). Lymphatic drainage of the peritoneal cavity in sheep. *Am J Physiol* 260, F353-358.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Aldridge, J.R., Jr., Moseley, C.E., Boltz, D.A., Negovetich, N.J., Reynolds, C., Franks, J., Brown, S.A., Doherty, P.C., Webster, R.G., and Thomas, P.G. (2009). TNF/ iNOS -producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5306-5311.

Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8 α^+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.

Allenspach, E.J., Lemos, M.P., Porrett, P.M., Turka, L.A., and Laufer, T.M. (2008). Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* 29, 795-806.

Anderson, S., Shires, V.L., Wilson, R.A., and Mountford, A.P. (1999). Formation of multinucleated giant cells in the mouse lung is promoted in the absence of interleukin-12. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 371-378.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., and Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7, 975-987.

Aoshiba, K., Tamaoki, J., and Nagai, A. (2001). Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1392-1401.

Archambaud, C., Salcedo, S.P., Lelouard, H., Devilard, E., de Bovis, B., Van Rooijen, N., Gorvel, J.P., and Malissen, B. (2010). Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *Eur J Immunol* 40, 3458-3471.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup,

N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., *et al.* (2009a). CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009b). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.

Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15, 929-937.

Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 6, 498-510.

Barrett, N.A., Fernandez, J.M., Maekawa, A., Xing, W., Li, L., Parsons, M.W., Austen, K.F., and Kanaoka, Y. (2012). Cysteinyl leukotriene 2 receptor on dendritic cells negatively regulates ligand-dependent allergic pulmonary inflammation. *J Immunol* 189, 4556-4565.

Barrett, N.A., Maekawa, A., Rahman, O.M., Austen, K.F., and Kanaoka, Y. (2009). Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol* 182, 1119-1128.

Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., *et al.* (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 119, 3723-3738.

Blease, K., Mehrad, B., Standiford, T.J., Lukacs, N.W., Gosling, J., Boring, L., Charo, I.F., Kunkel, S.L., and Hogaboam, C.M. (2000). Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2^{-/-} mice. *J Immunol* 165, 2603-2611.

Brottman, G.M., Regelman, W.E., Slungaard, A., and Wangenstein, O.D. (1996). Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig. *Pediatr Pulmonol* 21, 159-166.

Campbell, E.M., Charo, I.F., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Boring, L., Gosling, J., and Lukacs, N.W. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2^{-/-} mice: the role of mast cells. *J Immunol* 163, 2160-2167.

Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-

Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, 362-375.

Cassado Ados, A., D'Imperio Lima, M.R., and Bortoluci, K.R. (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* 6, 225.

Chen, L., Zhang, Z., Barletta, K.E., Burdick, M.D., and Mehrad, B. (2013). Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes during pneumonia: contribution of chemokine receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305, L702-711.

Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 25, 745-785.

den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.

Denburg, J.A. (1998). The origins of basophils and eosinophils in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 102, S74-76.

Dockrell, D.H., Marriott, H.M., Prince, L.R., Ridger, V.C., Ince, P.G., Hellewell, P.G., and Whyte, M.K. (2003). Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol* 171, 5380-5388.

Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H. (2013). Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 38, 570-580.

Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., *et al.* (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91-104.

Feng, Y.H., and Mao, H. (2012). Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages. *J Zhejiang Univ Sci B* 13, 386-394.

Fitzpatrick, A.M., Holguin, F., Teague, W.G., and Brown, L.A. (2008). Alveolar macrophage phagocytosis is impaired in children with poorly controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1372-1378, 1378 e1371-1373.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-87.

Fujimura, N., Xu, B., Dalman, J., Deng, H., Aoyama, K., and Dalman, R.L. (2015). CCR2 inhibition sequesters multiple subsets of leukocytes in the bone marrow. *Sci Rep* 5, 11664.

Gao, Y., Nish, S.A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limon, P., Weinstein, J.S., Zhao, H., and Medzhitov, R. (2013). Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* 39, 722-732.

Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., and Simon, H.U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 34, 398-409.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., *et al.* (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205, 1621-1634.

Gilliet, M., and Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 20, 401-407.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 392-404.

Gleich, G.J., Frigas, E., Loegering, D.A., Wassom, D.L., and Steinmuller, D. (1979). Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* 123, 2925-2927.

Goldszmid, R.S., Caspar, P., Rivollier, A., White, S., Dzutsev, A., Hieny, S., Kelsall, B., Trinchieri, G., and Sher, A. (2012). NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36, 1047-1059.

Gordon, J.R., Burd, P.R., and Galli, S.J. (1990). Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 11, 458-464.

Gordon, J.R., and Galli, S.J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346, 274-276.

Gour, N., and Wills-Karp, M. (2015). IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*.

Granucci, F., Feau, S., Angeli, V., Trottein, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2003). Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol* 170, 5075-5081.

Gregory, L.G., and Lloyd, C.M. (2011). Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* 32, 402-411.

Griseri, T., Arnold, I.C., Pearson, C., Krausgruber, T., Schiering, C., Franchini, F., Schulthess, J., McKenzie, B.S., Crocker, P.R., and Powrie, F. (2015). Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated Eosinophils Promote Interleukin-23 Driven Chronic Colitis. *Immunity* 43, 187-199.

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 210, 1977-1992.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571-578.

Hackstein, H., Kranz, S., Lippitsch, A., Wachtendorf, A., Kershaw, O., Gruber, A.D., Michel, G., Lohmeyer, J., Bein, G., Baal, N., and Herold, S. (2013). Modulation of respiratory dendritic cells during *Klebsiella pneumoniae* infection. *Respir Res* 14, 91.

Haniffa, M., Collin, M., and Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv Immunol* 120, 1-49.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol* 12, 778-785.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., *et al.* (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792-804.

Herold, S., Mayer, K., and Lohmeyer, J. (2011a). Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol* 2, 65.

Herold, S., Tabar, T.S., Janssen, H., Hoegner, K., Cabanski, M., Lewe-Schlosser,

P., Albrecht, J., Driever, F., Vadasz, I., Seeger, W., *et al.* (2011b). Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 1380-1390.

Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* 14, 821-830.

Hiura, T.S., Kaszubowski, M.P., Li, N., and Nel, A.E. (1999). Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 163, 5582-5591.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., *et al.* (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209, 1167-1181.

Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14, 81-93.

Huynh, M.L., Malcolm, K.C., Kotaru, C., Tilstra, J.A., Westcott, J.Y., Fadok, V.A., and Wenzel, S.E. (2005). Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 972-979.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., *et al.* (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599-610.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12, 557-569.

Kankaanranta, H., Moilanen, E., and Zhang, X. (2005). Pharmacological regulation of human eosinophil apoptosis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 433-445.

Kim, Y., Sung, S., Kuziel, W.A., Feldman, S., Fu, S.M., and Rose, C.E., Jr. (2001). Enhanced airway Th2 response after allergen challenge in mice deficient in CC chemokine receptor-2 (CCR2). *J Immunol* 166, 5183-5192.

Kirby, A.C., Coles, M.C., and Kaye, P.M. (2009). Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. *J Immunol* 183, 1983-1989.

Kirby, A.C., Raynes, J.G., and Kaye, P.M. (2006). CD11b regulates recruitment of alveolar macrophages but not pulmonary dendritic cells after pneumococcal challenge. *J*

Infect Dis 193, 205-213.

Kiwamoto, T., Katoh, T., Evans, C.M., Janssen, W.J., Brummet, M.E., Hudson, S.A., Zhu, Z., Tiemeyer, M., and Bochner, B.S. (2014). Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis. *J Allergy Clin Immunol* 135, 1329-1340 e1321-1329.

Kleine, T.J., Gleich, G.J., and Lewis, S.A. (1998). Eosinophil major basic protein increases membrane permeability in mammalian urinary bladder epithelium. *Am J Physiol* 275, C93-C103.

Kondo, M., Scherer, D.C., King, A.G., Manz, M.G., and Weissman, I.L. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11, 520-526.

Kool, M., Soullie, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205, 869-882.

Kopf, M., Schneider, C., and Nobs, S.P. (2015). The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol* 16, 36-44.

Kouro, T., and Takatsu, K. (2009). IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol* 21, 1303-1309.

Lambrecht, B.N. (2006). Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24, 366-368.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30, 243-270.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 134, 499-507.

Landsman, L., and Jung, S. (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179, 3488-3494.

Lee, Y.G., Jeong, J.J., Nyenhuis, S., Berdyshev, E., Chung, S., Ranjan, R., Karpurapu, M., Deng, J., Qian, F., Kelly, E.A., *et al.* (2014). Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl₂, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52, 772-784.

Leon, B., and Ardavin, C. (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 86, 320-324.

Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519-531.

Liang, J., Jung, Y., Tighe, R.M., Xie, T., Liu, N., Leonard, M., Gunn, M.D., Jiang, D., and Noble, P.W. (2012). A macrophage subpopulation recruited by CC chemokine ligand-2 clears apoptotic cells in noninfectious lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302, L933-940.

Lichtenstein, L.M., Marone, G., Thomas, L.L., and Malveaux, F.J. (1978). The role of basophils in inflammatory reactions. *J Invest Dermatol* 71, 65-69.

Lin, K.L., Suzuki, Y., Nakano, H., Ramsburg, E., and Gunn, M.D. (2008). CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J Immunol* 180, 2562-2572.

Liu, K., Vitoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392-397.

Lopez-Bravo, M., Minguito de la Escalera, M., Dominguez, P.M., Gonzalez-Cintado, L., del Fresno, C., Martin, P., Martinez del Hoyo, G., and Ardavin, C. (2013). IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation. *J Allergy Clin Immunol* 132, 1409-1419.

Lundstrom, S.L., Saluja, R., Adner, M., Haeggstrom, J.Z., Nilsson, G., and Wheelock, C.E. (2012). Lipid mediator metabolic profiling demonstrates differences in eicosanoid patterns in two phenotypically distinct mast cell populations. *J Lipid Res* 54, 116-126.

MacKenzie, J.R., Mattes, J., Dent, L.A., and Foster, P.S. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167, 3146-3155.

MacLean, J.A., Xia, W., Pinto, C.E., Zhao, L., Liu, H.W., and Kradin, R.L. (1996). Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am J Pathol* 148, 657-666.

Marriott, H.M., Hellewell, P.G., Cross, S.S., Ince, P.G., Whyte, M.K., and Dockrell, D.H. (2006). Decreased alveolar macrophage apoptosis is associated with increased pulmonary inflammation in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 177, 6480-6488.

Misharin, A.V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., and Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse

lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 503-510.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047.

Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217-1226.

Nakano, H., Burgents, J.E., Nakano, K., Whitehead, G.S., Cheong, C., Bortner, C.D., and Cook, D.N. (2012a). Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage. *Mucosal Immunol*.

Nakano, H., Free, M.E., Whitehead, G.S., Maruoka, S., Wilson, R.H., Nakano, K., and Cook, D.N. (2012b). Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunol* 5, 53-65.

Nakano, H., Moran, T.P., Nakano, K., Gerrish, K.E., Bortner, C.D., and Cook, D.N. (2015). Complement receptor C5aR1/CD88 and dipeptidyl peptidase-4/CD26 define distinct hematopoietic lineages of dendritic cells. *J Immunol* 194, 3808-3819.

Nieuwenhuizen, N.J., Green, S.A., Chen, X., Bailleul, E.J., Matich, A.J., Wang, M.Y., and Atkinson, R.G. (2012). Functional genomics reveals that a compact terpene synthase gene family can account for terpene volatile production in apple. *Plant Physiol* 161, 787-804.

Ohnmacht, C., Pullner, A., van Rooijen, N., and Voehringer, D. (2007). Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J Immunol* 179, 4766-4774.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-1216.

Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10, 225-235.

Pellicciari, C., Manfredi, A.A., Bottone, M.G., Schaack, V., and Barni, S. (1993). A single-step staining procedure for the detection and sorting of unfixed apoptotic thymocytes. *Eur J Histochem* 37, 381-390.

Peters, W., Scott, H.M., Chambers, H.F., Flynn, J.L., Charo, I.F., and Ernst,

J.D. (2001). Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7958-7963.

Plantinga, M., Guillems, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., *et al.* (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38, 322-335.

Prieditis, H., and Adamson, I.Y. (1996). Alveolar macrophage kinetics and multinucleated giant cell formation after lung injury. *J Leukoc Biol* 59, 534-538.

Qu, C., Edwards, E.W., Tacke, F., Angeli, V., Llodra, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N.S., Peters, W., van Rooijen, N., *et al.* (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 200, 1231-1241.

Radlinger, M., Bossios, A., Sjostrand, M., Lu, Y., Malmhall, C., Dahlborn, A.K., Lee, J.J., and Lotvall, J. (2010). Local proliferation and mobilization of CCR3(+) CD34(+) eosinophil-lineage-committed cells in the lung. *Immunology* 132, 144-154.

Randall, T.D. (2010). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol* 107, 187-241.

Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2012). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29, 163-183.

Riley, J.F., and West, G.B. (1953). The presence of histamine in tissue mast cells. *J Physiol* 120, 528-537.

Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., and Kelsall, B.L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* 209, 139-155.

Rodero, M.P., Poupel, L., Loyher, P.L., Hamon, P., Licata, F., Pessel, C., Hume, D.A., Combadiere, C., and Boissonnas, A. (2015). Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *Elife* 4.

Romagnani, S. (2002). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol* 38, 881-885.

Rose, C.E., Jr., Lannigan, J.A., Kim, P., Lee, J.J., Fu, S.M., and Sung, S.S. (2010). Murine lung eosinophil activation and chemokine production in allergic airway inflammation. *Cell Mol Immunol* 7, 361-374.

Rothenberg, M.E. (1998). Eosinophilia. *N Engl J Med* 338, 1592-1600.

Said, A., and Weindl, G. (2015). Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. *J Immunol Res* 2015, 743169.

Schneider, C., Nobs, S.P., Kurrer, M., Rehrauer, H., Thiele, C., and Kopf, M. (2014). Induction of the nuclear receptor PPAR-gamma by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat Immunol* 15, 1026-1037.

Schreiber, H.A., Harding, J.S., Hunt, O., Altamirano, C.J., Hulseberg, P.D., Stewart, D., Fabry, Z., and Sandor, M. (2011). Inflammatory dendritic cells migrate in and out of transplanted chronic mycobacterial granulomas in mice. *J Clin Invest* 121, 3902-3913.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., *et al.* (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86-90.

Scott, C.L., Henri, S., and Guilliams, M. (2014). Mononuclear phagocytes of the intestine, the skin, and the lung. *Immunol Rev* 262, 9-24.

Seder, R.A., Paul, W.E., Dvorak, A.M., Sharkis, S.J., Kagey-Sobotka, A., Niv, Y., Finkelman, F.D., Barbieri, S.A., Galli, S.J., and Plaut, M. (1991). Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2835-2839.

Seo, S.U., Kwon, H.J., Ko, H.J., Byun, Y.H., Seong, B.L., Uematsu, S., Akira, S., and Kweon, M.N. (2011). Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS Pathog* 7, e1001304.

Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19-30.

Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., and Altare, F. (2012). The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol* 2012, 139127.

Sminia, T., van der Brugge-Gamelkoorn, G.J., and Jeurissen, S.H. (1989). Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol* 9, 119-150.

Snelgrove, R.J., Goulding, J., Didierlaurent, A.M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., Gwyer, E., Sedgwick, J.D., Barclay, A.N., and Hussell, T. (2008). A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol* 9, 1074-1083.

Soroosh, P., Doherty, T.A., Duan, W., Mehta, A.K., Choi, H., Adams, Y.F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D.H., and Croft, M. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med*

210, 775-788.

Steinke, J.W., and Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2, 66-70.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.

Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125, S73-80.

Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

Takahashi, K., and Naito, M. (1993). Development, differentiation, and proliferation of macrophages in the rat yolk sac. *Tissue Cell* 25, 351-362.

Tamoutounour, S., Guillemins, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., *et al.* (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925-938.

Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., van der Woude, C.J., Woltman, A.M., Reyat, Y., Bonnet, D., Sichien, D., *et al.* (2012). CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol* 42, 3150-3166.

Tarling, J.D., and Coggle, J.E. (1982). Evidence for the pulmonary origin of alveolar macrophages. *Cell Tissue Kinet* 15, 577-584.

Tilney, N.L. (1971). Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat* 109, 369-383.

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Gioannini, T.L., Weiss, J.P., and Karp, C.L. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457, 585-588.

Tschernig, T., and Pabst, R. (2000). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* 68, 1-8.

Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902-909.

Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G.E., Kretzer, N.M., Iwata, A., Bagaitkar, J., Wu, X., Wong, R., Anderson, D.A., Murphy, T.L., *et al.* (2015). Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity* 42, 916-928.

Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204, 171-180.

Walsh, G.M. (2013). Eosinophil apoptosis and clearance in asthma. *J Cell Death* 6, 17-25.

Walsh, K.P., and Mills, K.H. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol* 34, 521-530.

Warmington, K.S., Boring, L., Ruth, J.H., Sonstein, J., Hogaboam, C.M., Curtis, J.L., Kunkel, S.L., Charo, I.R., and Chensue, S.W. (1999). Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation: analysis of cellular recruitment and cytokine responses. *Am J Pathol* 154, 1407-1416.

Westphalen, K., Gusarova, G.A., Islam, M.N., Subramanian, M., Cohen, T.S., Prince, A.S., and Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* 506, 503-506.

Wolf, A.J., Linas, B., Trevejo-Nunez, G.J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2007). Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 179, 2509-2519.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455.

Xiong, H., Carter, R.A., Leiner, I.M., Tang, Y.W., Chen, L., Kreiswirth, B.N., and Pamer, E.G. (2015). Distinct Contributions of Neutrophils and CCR2⁺ Monocytes to Pulmonary Clearance of Different *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Infect Immun* 83, 3418-3427.

Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., *et al.* (2013). Fate mapping reveals origins and

dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91.

Young, J.D., Peterson, C.G., Venge, P., and Cohn, Z.A. (1986). Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321, 613-616.

Zaslona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van Rooijen, N., Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J.J., Wilkinson, J.E., Moore, B.B., and Peters-Golden, M. (2014). Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *J Immunol* 193, 4245-4253.

Zelante, T., Fric, J., Wong, A.Y., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Front Immunol* 3, 161.

Zhou, Q., Ho, A.W., Schlitzer, A., Tang, Y., Wong, K.H., Wong, F.H., Chua, Y.L., Angeli, V., Mortellaro, A., Ginhoux, F., and Kemeny, D.M. (2014). GM-CSF-licensed CD11b⁺ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*. *J Immunol* 193, 496-509.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28, 445-489.

ANEXO

AGRADECIMIENTOS

Por último, me gustaría dar las gracias a todos los que han formado parte de esto, los que han estado en el día a día y los que han estado más de vez en cuando. En estos cinco años he aprendido mucho, tanto en lo personal como en lo profesional, y todos habéis puesto vuestro granito de arena.

Gracias a Carlos, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y por haber creído en mí. Siempre has sabido valorar mi trabajo y motivarme para seguir adelante.

María, tú eres el motor del laboratorio. Gracias porque en estos cinco años siempre has estado dispuesta a ayudarme, enseñarme y aprender conmigo. No pierdas la ilusión por la ciencia.

A ti, Leti, gracias por hacer de nexo profesional y personal entre todos los componentes del laboratorio. Hemos sido un buen grupo, en gran parte gracias a ti. Gracias también por tu positivismo y porque siempre has tenido buenas palabras conmigo. Te voy a echar mucho de menos.

Muchas gracias también a Lidia, mi aprendiz, por ayudarme tantísimo en esta última etapa. Mucho ánimo para el tiempo que te queda. Jorge, el más social y alegre del laboratorio, gracias por todos tus aportes de humor y por esas conversaciones arreglando al mundo en el citómetro. Te va a ir muy bien, no hay duda. Y la última incorporación, Laura, sigue así de positiva, es muy importante esa actitud en este mundillo!

También quiero acordarme de todos los que han pasado por el laboratorio durante estos años: Elena, Ruth, Charly, Patry, Didier y en especial de Pilar. Gracias por ocuparte de mí en mis inicios, no sólo me enseñaste ciencia, también una actitud y una forma de trabajar.

Gracias también a nuestros compañeros de laboratorio, a Katy, Gorjana y Rajman, por su compañerismo y buena disposición. Al DIO en general, por ser una gran familia, siempre es agradable intercambiar un saludo o una sonrisa por los pasillos. A Antonio, porque tu trabajo facilita en gran medida el nuestro y por cuidar de nosotros “a tu manera”. Coral, gracias por estar siempre pendiente de todo y ayudarnos en todo lo que está en tu mano. A Anabel porque siempre que hemos tenido problemas o dudas respecto a los microscopios, has acudido en nuestra ayuda.

Tampoco quiero olvidarme de los servicios. Gracias al personal de cocina, por su amabilidad y disposición. A citometría, porque me he pasado ahí muchas horas, gracias a Sara y a M^a Carmen por enseñarme y solucionarme las dudas que me han surgido durante estos años. A histología, Soledad y Óscar, porque siempre nos atendéis con una sonrisa, aunque os pidamos cosas “fuera de lo común”.

Mención especial merece el animalario, ya que los animalillos son una parte muy importante de nuestros experimentos. En primer lugar, quiero agradecer a Iván su eficiencia, sus ganas de aprender y de hacer bien su trabajo. Gran parte de mis experimentos implican pasar la mañana en *Inoculados*, y siempre consigue que subamos con una sonrisa para afrontar el resto del día. Gracias por hacernos el trabajo ahí abajo fácil y agradable. A

Raquel, por la eficiente gestión de las colonias y su trato personalizado. Somos muchos usuarios con costumbres y manías diferentes, y aun así, haces todo lo posible para dar gusto a todos. A Antonio, por su trayectoria intachable, gracias por la capacidad de buscar soluciones y alternativas a los pequeños imprevistos que surgen en el día a día. Gracias también a Javi, por sus ganas de aprender y de enseñar, por mover cielo y tierra cuando quise aprender a pinchar i.t., y por todos sus consejos. A Alberto, por su impecable gestión y organización y por estar siempre disponible. A Sergio, porque aunque no haya trabajado directamente con él, siempre tiene una sonrisa para todo el mundo. Y en general a todos los integrantes del animalario, a los de lavado, los cuidadores de zonas... porque hay mucha gente detrás trabajando para que nosotros no tengamos que preocuparnos.

Y fuera del CNB también tengo que agradecer mucho. Gracias a mis amigas: Cris, Esther, Eri, Lau, Laury, Lei, Marti, y Mero, porque siempre han tenido fe en mi carrera científica. Por demostrar interés y curiosidad en lo que hago (sobre todo si se trata de ratones...:P). Gracias Laury porque, como la otra científica del grupo, en ti he encontrado un gran apoyo. Y en especial a ti Lau... por tantos años juntas y los que quedan, por ser una amiga incondicional, y porque sé que estás tan orgullosa de mi como yo lo estoy de ti. Gracias también a Alan, porque me enseñaste mucho al principio de los tiempos y te sigues preocupando por mi desde la lejanía.

A toda mi familia, por estar pendiente de mí todo este tiempo. Por hacer un esfuerzo en entender lo que hago, aunque vengáis de mundos totalmente diferentes. Gracias Cocó por estar orgullosa de mi y presumir de nieta. A la abuela Mari porque, como buena abuela, siempre me dice lo bien que me ve. A mis hermanos y mis cuñadas: José, Celia, Alberto (Enano) y Eva. Gracias por ese buen equipo que hacemos, gracias por estar siempre dispuestos a hacer planes todos juntos y disfrutar de cada momento.

Gracias a mis padres porque son mi gran apoyo. Por participar en todas mis decisiones y por darme la seguridad de que siempre vais a estar ahí tanto si va bien, como si va mal. Gracias por estar tan orgullosos de mí. Papá, tú me has enseñado a valorar las cosas importantes y a “no complicarme la vida” por lo que no lo es. Y tú, mamá, gracias por darme siempre buenos consejos. Porque podemos estar hablando horas de todo y de nada a la vez. Gracias por ser además de una madre, una amiga.

Y por supuesto, gracias a Alberto. Porque has estado y has participado de todas las grandes decisiones de mi vida. Gracias por enseñarme a ver el lado positivo de las cosas y no dejar que me rinda nunca. Pero sobre todo, gracias por cuidarme y hacerme feliz día a día.